

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 682 967

②1 N° d'enregistrement national :

91 13227

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 N 15/11, 15/67, 15/70, 1/21, A 61 K 39/12(C 12 N 1/21, 1:125, 1:19, 1:32)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 25.10.91.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 30.04.93 Bulletin 93/17.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *INSTITUT PASTEUR Fondation privée reconnue d'utilité publique — FR et MASSEY UNIVERSITY Etablissement public — NZ.*

⑦2 Inventeur(s) : Murray Alan, Gheorghiu Marina et Gicquel Brigitte.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Gutmann Ernest - Plasseraud Yves S.A.

⑤4 Nouveau promoteur de M. Paratuberculosis. Son utilisation pour le clonage et l'expression de séquences nucléotidiques.

⑤7 L'invention concerne une séquence nucléotidique de M. paratuberculosis (Mptb), caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'ADN comprenant:

- a) la séquence nucléotidique de 716pb (PstI/BamHI), ou une partie de cette séquence,
- b) une séquence hybridant avec la séquence complémentaire de la séquence a).

Utilisation pour l'expression de séquences d'acide nucléique dans un hôte cellulaire.

FR 2 682 967 - A1



Nouvelle séquence de M. paratuberculosis.
Son utilisation pour le clonage et
l'expression de séquences nucléotidiques

L'invention a pour objet une séquence nucléotidique permettant de cloner ou d'exprimer des enchaînements nucléotidiques dans un hôte cellulaire déterminé.

Une séquence nucléotidique de l'invention peut être obtenue à partir de Mycobacterium paratuberculosis.

Parmi les mycobactéries, on connaît particulièrement certaines souches et par exemple le bacille Calmette et Guérin (BCG), qui est une souche avirulente de Mycobacterium bovis largement utilisée dans le cadre de la vaccination contre la tuberculose dans le monde. Ses caractéristiques biologiques en font un candidat intéressant pour le développement de vaccins recombinants. La paroi cellulaire fonctionne comme un adjuvant très efficace et une seule inoculation peut déclencher une immunité de longue durée. Les effets secondaires graves dus à ce bacille sont rares même lors d'immunisations répétées.

L'induction d'une immunité spécifique, suivant la vaccination par le BCG est initiée lorsque des cellules T interagissent avec des macrophages présentant des antigènes de mycobactéries en association avec les produits du complexe majeur d'histocompatibilité (abréviation CMH). Les clones de cellules T sensibilisées prolifèrent et produisent des lymphokines qui activent en retour les macrophages pour éliminer de façon non spécifique les bacilles. En outre des cellules T auxiliaires induisent la prolifération de clones de cellules B conduisant à la production d'anticorps.

Des tentatives ont déjà été faites pour effectuer le clonage et l'expression de gènes hétérologues dans le BCG, notamment en utilisant les connaissances disponibles sur les vecteurs réplicatifs ou intégratifs. Ainsi un épitope de la protéine gag de HIV-1 a été cloné sous forme d'un polypeptide de fusion avec l'antigène α , cet antigène étant une des protéines majeures exportées par des mycobactéries, notamment le BCG ou Mycobacterium Kansasii et des gènes de résistance à des antibiotiques ont été exprimés sous le contrôle de leur propre région de régulation. Afin d'optimiser l'expression d'antigènes hétérologues dans des recombinants BCG, les inventeurs ont orienté leurs recherches vers la caractérisation des unités de régulation de gènes, fonctionnelles dans les mycobactéries.

Les inventeurs ont ainsi décrit l'isolement et la caractérisation à partir de Mycobacterium paratuberculosis de séquences nucléotidiques permettant l'expression d'acides nucléiques donnés chez les mycobactéries ou chez d'autres hôtes cellulaires.

On entend par acide nucléique, toute séquence de nucléotides susceptible d'être clonée et/ou exprimée, quelle que soit sa composition, sa longueur, ou son origine (obtenue par extraction ou synthétique).

Différents travaux ont été effectués à partir de M. paratuberculosis (désigné également dans la suite par Mptb) et Green et al (Nucleic Acids Research Vol. 17 (22) 1989, pages 9063-9072) ont en particulier caractérisé et séquencé un élément d'insertion de cette mycobactérie, élément qui a été appelé IS900. Selon Green et al, cet élément d'insertion contient une phase ouverte de lecture, appelée ORF1197 codant pour une protéine de 399 acides aminés.

Les inventeurs ont recherché des séquences spécifiques de l'espèce Mycobacterium paratuberculosis, par criblage d'une banque génomique lambda gt11 en effectuant des tests d'hybridation avec l'ADN de souches d'autres mycobactéries en particulier de M. phlei décrit dans Murray A. et al New Zeland, Veterinary Journal 37: 47-50. A cette occasion, ils se sont intéressés à une séquence d'ADN spécifique, qui contenait un fragment adjacent à l'élément IS900 décrit par Green et al.

Ils ont déterminé la présence d'une séquence adjacente à la partie 5' de la séquence inverse complémentaire de la phase ouverte de lecture codant pour une transposase potentielle et contenue sur l'élément d'insertion IS900 ; cette nouvelle séquence est susceptible d'avoir des fonctions promoteur et de contenir des signaux importants pour la régulation de la transcription et de la traduction.

Une séquence nucléotidique selon l'invention utilisable pour le clonage et/ou l'expression d'un acide nucléique est caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence (I), choisie parmi :

- a) la séquence représentée à la figure 2 ou toute partie de cette séquence susceptible d'intervenir dans l'expression d'un acide nucléique qui serait placé sous son contrôle,
- b) une séquence hybridant avec la séquence complémentaire de la séquence a) dans des conditions données ci-dessous.

Une partie de la séquence I intéressante dans le cadre de l'invention, peut être définie en réalisant un test tel que le suivant: une partie déterminée de la séquence I est clonée en amont d'un vecteur de reconnaissance de promoteur et d signaux de

traduction, contenant par exemple le gène de la β -galactosidase, dépourvu de son promoteur et de ses huit premiers acides aminés.

Les conditions de réalisation du test peuvent être établies sur la base de la description correspondant aux constructions des figures 7 à 9. Une partie ainsi testée de la séquence I, intéressante dans le cadre de l'invention conduit à la synthèse d'une protéine ayant une activité β -galactosidase chez différents hôtes cellulaires, par exemple les actinomycètes .

Une première séquence nucléotidique particulièrement avantageuse selon l'invention, utilisable pour le clonage et/ou l'expression d'un acide nucléique est la séquence (II), caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a) la séquence nucléotidique suivante ou toute partie de cette séquence contenant notamment le site d'initiation de la transcription (position +1) et des éléments nécessaires à la reconnaissance et à la fixation des ARN polymérases d'un hôte cellulaire déterminé qui serait transformé par cette séquence, ces éléments comprenant en particulier les séquences [TAC ACT] en position -10 par rapport au site d'initiation de transcription et [TC GAC A] en position -35 par rapport à ce site :

GAT CCC GTG ACA AGG CCG AAG AGC CCG CGA CCG TGC GGT CGT

CGA CGA CCG AGT GTG AGC AGA CCC CCT GGT GAA GGG TGA ATC

+1

GAC AGG TAC ACA CAG CCG CCA TAC ACT TCG CTT CAT GCC CTT

ACG GGG GGC GGC CAA CCC AGA AGG AGA TTC TCA

- b) une séquence hybridant avec la séquence complémentaire de la séquence a) dans des conditions données ci-dessous.

Les conditions d'hybridation dont il est question ci-dessus peuvent être décrites comme suit :

On utilise par exemple une sonde déterminée à partir de la séquence avec laquelle on souhaite tester l'hybridation, marquée au ^{32}p (10^6 cpm/ml) que l'on met en contact avec la séquence testée pendant 16 heures à 65°C dans une solution d'hybridation (formamide 50%, 5 x SSPE, DNA de sperme de saumon 200 $\mu\text{g/ml}$ et 10 x Denhart). Les membranes sur lesquelles est réalisée l'hybridation sont ensuite lavées deux fois pendant 30 minutes avec une solution 1SSC, 0,1% SDS à température ambiante (20°C) puis lavées deux fois avec 0,1SSC, 0,1% SDS pendant 30 minutes à 65°C .

Composition de 5 x SSPE :

NaCl	: 900 mM
NaH_2PO_4	: 450 mM
Na_2EDTA	: 5 mM
pH	: 7,4

Denhart :

ficoll	: 2,5 g/l
polyvinylpyrrolidone	: 2,5 g/l
BSA (Pentex fraction V)	: 2,5 g/l

0,1 x SSC :

NaCl	: 15 mM
Na_3 citrate	: 0,1%

Le nucléotide A marqué +1 correspond à un site d'initiation de transcription déterminé dans le cadre de l'invention et la séquence nucléotidique en amont de ce site comporte des éléments de reconnaissance et de fixation pour des ARN polymérases d'hôtes cellulaires (régions -35 et -10) chez lesquels la séquenc est

susceptible d'être utilisée comme promoteur pour le clonage ou l'expression de séquences d'acides nucléiques déterminées. Les régions -35 et -10 sont localisées par rapport au site +1.

Les séquences ci-dessus (séquence I et II) contiennent la séquence minimum nécessaire à l'initiation de la transcription définie ci-dessus ainsi que des fragments en amont et en aval de cette séquence, susceptibles de jouer un rôle dans la régulation de la transcription et/ou de l'expression. Par exemple ces séquences comportent un enchaînement de type séquence Shine Dalgarno [A AGG AG], intervenant dans la fixation du ribosome.

Une autre séquence nucléotidique susceptible de permettre l'expression dans un hôte cellulaire, d'un enchaînement nucléotidique est selon l'invention caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'ADN (III) choisie parmi :

a) la séquence nucléotidique suivante :

+1

TC GAC AGG TAC ACA CAG CCG CCA TAC ACT TCG CTT CA

b) une séquence hybridant avec la séquence complémentaire de la séquence a) dans des conditions ci-dessous,

c) toute partie de cette séquence intervenant dans l'activité de transcription d'un acide nucléique.

La séquence désignée sous b) définie par sa capacité d'hybridation avec I, II ou III donne dans chaque cas les variants de la séquence de l'invention qui tout en étant modifiés au niveau d'un ou plusieurs nucléotides conservent les propriétés des séquences I, II ou III de l'invention dans la transcription d'un acide nucléique. Les modifications susceptibles d'être

introduites au niv au de variants sont par exemple des substitutions, des insertions, des délétions ou des inversions de nucléotides.

La séquence nucléotidique comprenant une des séquences I, II ou III ou un variant de I, II ou III, contient un enchaînement nucléotidique pouvant fonctionner comme promoteur pour l'expression de séquences données d'acide nucléique.

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être aussi désignées dans la suite par l'expression "séquence contenant le promoteur" lorsqu'elles contiennent l'enchaînement III.

Le cas échéant, la séquence III peut être mise en oeuvre avec un fragment de la séquence I qui ne lui est pas nécessairement adjacent dans l'enchaînement I mais qui est susceptible d'intervenir avec I pour l'expression d'un acide nucléique donné.

Les susdites séquences peuvent être obtenues par extraction, purification à partir de l'ADN de M. paratuberculosis ou par synthèse chimique.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, tout variant d'une séquence nucléotidique comprenant les enchaînements I, II ou III ci-dessus décrits peut être défini par le fait qu'il conserve les propriétés fonctionnelles des enchaînements I, II ou III et notamment leur aptitude à remplir les fonctions de promoteur lors de la transcription de séquences nucléotidiques au sein d'un hôte donné.

Les éléments de la séquence nucléotidique I ou de la séquence II qui encadrent la séquence III peuvent être délétés au moins en partie et éventuellement substitués. Par exemple la séquence comprise entre les positions des nucléotides +2 et +41 par rapport au site d'initiation de transcription peut être remplacée pour

tout ou partie, par une séquence exogène par rapport à la séquence présente naturellement en aval de la séquence III chez Mptb, cette séquence exogène comportant une séquence de Shine Dalgarno susceptible d'être reconnue par le ribosome chez un hôte déterminé.

A titre d'exemple cette séquence comprise entre les positions +2 et +41 peut être remplacée par une séquence exogène d'origine bactérienne, par exemple de E.coli comportant une séquence de Shine Dalgarno.

L'invention vise aussi l'utilisation de toute partie de la séquence I ou II en dehors des régions -35 et -10 ou de la séquence de Shine Dalgarno (SD), susceptible d'intervenir dans la transcription ou la traduction d'un acide nucléique donné.

L'invention vise également une séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique telle que définie plus haut et au moins une séquence d'acide nucléique, dont on souhaite obtenir le clonage et/ou l'expression dans un hôte cellulaire déterminé, sous le contrôle de ce promoteur.

Cette séquence peut être une séquence codant pour un peptide de Mptb, ou une séquence hétérologue codant pour un peptide ou un polypeptide d'origine différente.

Une séquence d'acide nucléique est considérée comme séquence hétérologue, dès lors qu'elle ne correspond pas à la séquence naturellement adjacente aux séquences I ou II chez Mptb, une partie de cette séquence naturellement adjacente correspondant à l'enchaînement de 716 bp représenté à la figure 2.

Les moyens de l'invention peuvent donc être mis en oeuvre pour l'expression dans un hôte cellulaire différent de Mptb, d'une séquence d'acide nucléique codant pour un peptide ou un polypeptide de Mptb, sous

le contrôle de la séquence nucléotidique de l'invention.

La séquence recombinante peut être utilisée à la fois pour cloner une séquence codante dans un hôte déterminé par exemple dans une bactérie telle que E.coli et ensuite transférer cette séquence pour l'exprimer dans un hôte différent par exemple chez un Actinomycète et notamment chez une souche de mycobactérie, en particulier une souche BCG.

L'invention peut être mise en oeuvre pour cloner ou exprimer tout type de séquences d'acides nucléiques et en particulier des séquences codant pour des peptides, polypeptides ou protéines (cet ensemble pouvant être désigné par l'expression polypeptide) ayant un caractère antigénique.

L'invention a par exemple pour objet une séquence recombinante particulière répondant à la définition précédente, caractérisée en ce qu'au moins une séquence d'acide nucléique placée sous le contrôle d'une séquence nucléotidique de l'invention I, II ou III définie ci-dessus, code pour un peptide ou un polypeptide immunogène ou susceptible d'être rendu immunogène.

A titre d'exemple une séquence d'acide nucléique à exprimer, incorporée à la séquence recombinante de l'invention peut être une séquence caractéristique d'un organisme pathogène. Des agents pathogènes sont par exemple des virus, des parasites, des bactéries. On cite notamment M. leprae, M. tuberculosis, M. intracellulare, M. africanum, M. avium, les sporozoïtes et les mérozoïtes de plasmodium, les bacilles responsables de la diphtérie, du tétanos, Leishmania, Salmonella, certains tréponèmes, la toxine de pertussis et d'autres micro-organismes pathogènes et viraux

notamment le virus des oreillons, de la rubéole, de l'herpes, d'influenza, de Schistosoma, de Shigella, de Neisseria, de Borrelia, le virus de la rage, de la polio, de l'hépatite, du SIDA HIV, HTLV-I, HTLV-II et SIV ainsi que des virus oncogènes.

La séquence d'acide nucléique à exprimer peut aussi coder pour une séquence immunogène par exemple de venin de serpent ou d'insecte.

La séquence nucléotidique recombinante peut ainsi contenir sous le contrôle de la même séquence nucléotidique de l'invention plusieurs séquences codantes d'antigènes, le cas échéant caractéristiques d'organismes différents.

De préférence l'invention vise une séquence recombinante caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique à exprimer code pour un peptide ou un polypeptide d'un rétrovirus HIV, par exemple un peptide ou un polypeptide d'enveloppe, ou un peptide ou un polypeptide de la protéine Nef, de HIV-1 ou de HIV-2.

D'autres séquences d'acide nucléique peuvent être mises en oeuvre dans le cadre de la réalisation de l'invention et on citera à titre d'exemple les antigènes ou les séquences immunogènes de mycobactéries, en particulier les protéines ou fragments des protéines correspondant à des gènes impliqués dans la virulence et des antigènes à potentiel protecteur. Un antigène est dit "à potentiel protecteur" s'il est susceptible de déclencher ou de favoriser une réponse immunitaire protectrice en particulier par production d'anticorps ou par induction d'une réponse immunitaire de type cellulaire, en particulier de type CTL.

On peut envisager de constituer une séquence recombinante dans laquelle la séquence nucléotidique de

l'invention interviendrait dans le contrôle de l'expression d'un ou plusieurs haptènes ou épitopes déterminés, appartenant le cas échéant à des organismes différents. Par ailleurs ces haptènes ou épitopes peuvent être associés à une séquence codant pour un antigène ou de façon générale un polypeptide utilisable comme protéine porteuse, notamment pour l'expression à la surface d'un hôte cellulaire, voire la sécrétion du ou des haptènes ou épitopes.

On entend par association soit la formation d'une séquence codante hybride entre les différentes séquences présentes dans la séquence recombinante ou une association sous forme d'éléments codants d'un opéron, les différentes séquences codantes gardant dans ce cas leur individualité lors de l'expression dans un hôte cellulaire soit la formation d'une protéine fusion résultant de l'expression d'un gène fusion.

La séquence nucléotidique I, II ou III de l'invention peut être placée soit en amont de la séquence nucléotidique à exprimer et en phase avec cette séquence, soit en aval de la séquence d'acide nucléique à exprimer. Le choix de sa position relative par rapport à la séquence codante peut être déterminé en fonction du taux d'expression recherché dans un hôte déterminé.

Dans la séquence nucléotidique recombinante de l'invention, une séquence nucléotidique selon l'invention et la ou les séquence (s) d'acide nucléique à exprimer peuvent donc constituer un opéron de fusion. Dans ce cas si plusieurs acides nucléiques sont présents, ils sont exprimés sous le contrôle de la séquence mais sous forme de produit individualisé.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la séquence nucléotidique I, II ou III et la ou l s

séquence (s) d'acide nucléique (s) à exprimer constituent un gène de fusion. Dans ce cas le produit de l'expression de ce gène est constitué par une protéine hybride ou protéine de fusion lorsque plusieurs acides nucléiques sont utilisés.

L'invention concerne de façon générale l'utilisation d'une séquence nucléotidique selon la description précédente pour le clonage et/ou l'expression de séquences d'acide nucléique, dans un hôte cellulaire différent de Mptb, en particulier chez des Actinomycètes et notamment des Mycobactéries et notamment chez M. bovis par exemple chez la souche avirulente BCG, chez des bactéries Gram-négatives telles que E.coli ou chez des bactéries Gram-positives telles que B. subtilis.

Entre également dans le cadre de l'invention, un vecteur de clonage et/ou d'expression, de type intégratif ou de type réplcatif, caractérisé en ce qu'il comprend, en un site non essentiel respectivement pour son intégration ou pour sa réplcation, une séquence nucléotidique comprenant les enchaînements I, II ou III ou leurs variants, selon les définitions précédentes.

Ces vecteurs sont donc soit capables de se répliquer de façon extrachromosomale ou au contraire sous forme d'éléments intégrés au sein d'un chromosome ou plus généralement au sein d'un élément du génome d'un hôte auquel ils ont incorporés, y compris dans un plasmide ou un bactériophage présent dans cet hôte.

Un vecteur selon l'invention peut encore être caractérisé en ce qu'il est modifié en un site non essentiel respectivement pour son intégration ou pour sa réplcation, par une séquence nucléotidique recombinante décrite ci-dessus.

Un vecteur particulier comprend outre le promoteur et une séquence hétérologue, au moins une partie de la séquence désignée par ORF2 de Mptb (figure 10). Cette séquence est avantageusement placée en aval de la séquence contenant le promoteur, de préférence entre le promoteur et la séquence nucléique hétérologue. Avantageusement cette partie de ORF2 correspond à un enchaînement de 716 bp de Mptb tel que décrit à la figure 2.

A titre d'exemple de vecteurs satisfaisants pour réaliser l'invention, on peut citer les plasmides, les transposons, les phages ou tout autre vecteur utilisable pour l'expression d'une séquence. En particulier un plasmide intéressant, le cas échéant à titre de plasmide intermédiaire pour la réalisation de l'invention est une souche E.coli (Myc758) contenant le fragment de 716pb (PstI/BamHI) cloné dans le vecteur pUC18, déposée à la Collection Nationale des Microorganismes à Paris, France, sous le numéro I-1157 le 23 Octobre 1991.

Ce plasmide comprend notamment le promoteur de l'invention correspondant à la séquence II, délimité par les sites de restriction EcoRI/BglII (promoteur pan) ainsi qu'une séquence de liaison (linker).

A titre d'exemple de vecteurs on pourra citer les plasmides dérivés de pAL5000 (Ranzier et al, 1988, Gene 71:315-321), RSF1010 (Hermans et al, 1991, Mol. Microbiol. 5:1561-1566), pNG2 (Radford et al, 1991, Plasmid 25:149-153), les transposons dérivés de Tn610 et de IS6100 (Martin et al, 1990, Nature 345:739-743), IS900 (Green et al, Mol. Microbiol.), IS901 (Kunze et al, 1991, Mol. Microbiol. 5:2265-2272), IS6110 (Thierry et al, Nucl. Acids Res., 1990, 18:p188) et les phages L5 (Lee et al, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci., 88:

3111-3115), D29 (Tokunaga et al, 1964, J. Exptl. Med., 119:139-149).

D'autres éléments de séquences nucléotidiques peuvent être incorporés ou présents sur le vecteur de l'invention ; il peut s'agir par exemple de marqueurs d'expression et à cet égard on peut faire référence aux gènes de résistance à des antibiotiques tels que la kanamycine ou la viomycine. D'autres éléments de régulation peuvent être des séquences intervenant dans l'expression de la séquence codante et en particulier des séquences de type opérateur ou encore des éléments susceptibles de favoriser l'exportation, l'exposition au niveau de la membrane de l'hôte, l'excrétion ou la sécrétion du produit d'expression de la séquence hétérologue.

L'invention se rapporte également à un hôte cellulaire recombinant caractérisé en ce qu'il est transformé par une séquence nucléotidique recombinante ci-dessus décrite ou par un vecteur ci-dessus décrit, dans des conditions permettant l'expression de la (des) séquence (s) d'acide nucléique (s) à exprimer contenue (s) dans la séquence recombinante ou dans le vecteur.

Un hôte cellulaire particulièrement avantageux pour la réalisation de l'invention est un hôte qui permet l'exposition à sa surface, voire l'excrétion ou la sécrétion du produit d'expression de la (des) séquence (s) d'acide nucléique (s) à exprimer qu'il contient ou sa synthèse dans des conditions de localisation intracytoplasmique.

Des hôtes particuliers sont par exemple les souches d'Actinomycètes de préférence des souches avirulentes comme par exemple la souche avirulente BCG de l'INSTITUT PASTEUR n° 1137P2 utilisée pour constituer le vaccin commercialisé.

Les inventeurs ont constaté cependant que la séquence contenant le promoteur spécifique de Mptb est susceptible de fonctionner dans d'autres souches que les Actinomycètes et par exemple peut fonctionner dans une bactérie à gram-négatif comme E.coli. Cette séquence est aussi susceptible d'être utilisée dans des bactéries à gram-positif telles que B. subtilis ou dans des Streptomyces.

Un procédé adapté pour la préparation d'hôtes cellulaires recombinants selon l'invention est par exemple l'électroporation, conformément à la description de Snapper S. et al (1988, PNAS USA 85: 6985-6991) ou la conjugaison selon par exemple la technique de Lazraq R. et al (1990, FEMS Microbiol. Lett. 69: 135-138).

Compte tenu des propriétés intéressantes de ce promoteur, et de la possibilité d'exprimer dans des souches choisies et notamment dans des souches avirulentes des antigènes ou des séquences immunogènes, l'invention propose une composition immunogène caractérisée en ce qu'elle comprend un hôte cellulaire recombinant répondant aux critères précédents, en quantité suffisante pour déclencher la production d'anticorps, ou contribuer à la production d'anticorps de préférence protecteurs chez un hôte animal ou humain auquel elle est administrée.

Cette composition immunogène peut être mise en oeuvre pour le déclenchement d'une réponse protectrice contre un agent pathogène déterminé, par la production d'anticorps, et l'induction d'une réponse immunitaire de type cellulaire, dès lors que le produit d'expression de la séquence d'acide nucléique exprimée sous le contrôle des séquences I, II ou III est dans des conditions permettant de déclencher cette

production. La composition immunogène peut également être utilisée à titre de composition de rappel pour stimuler une production d'anticorps initiés par une protéine ou un autre constituant.

La réponse engendrée à la suite de l'administration de la composition immunogène peut être de type cellulaire ; il peut s'agir en particulier d'une séquence de type CTL.

L'invention permet donc de préparer également des vaccins de type vaccin mixte, dans lesquels la production d'anticorps sera dirigée à la fois contre l'hôte cellulaire et notamment contre le bacille BCG et contre le produit d'expression de la séquence d'acide nucléique à exprimer.

Outre ses propriétés intéressantes pour la réalisation d'un vaccin, une composition comprenant un hôte cellulaire recombinant selon l'invention, est utilisable pour effectuer de l'immunothérapie.

Un tel vaccin ou composition pour l'immunothérapie peut être utilisé chez l'animal ou chez l'homme et administré par voie intradermique, souscutanée, orale, d'aérosols ou percutanée. Plusieurs administrations, peuvent être nécessaires, par exemple sous forme de rappel, pour obtenir une protection suffisante.

Un hôte cellulaire recombinant selon l'invention peut aussi être utilisé pour produire toute protéine ou peptide en particulier à l'échelle industrielle. On peut ainsi utiliser l'invention pour la production d'antibiotiques.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples et dans les figures qui suivent.

F I G U R E S

Figure 1 : Description schématique de la construction de pAM320

L'ADN de Mptb est représenté en grisé par un double trait et le gène lacZ par un double trait. pAM3 a été digéré avec BamHI/PstI donnant lieu à un fragment de 716 bp qui a été récupéré sur un gel d'agarose à 1% en utilisant le système Geneclean. Le fragment a été ligaturé au plasmide pNM482 digéré par BamHI/PstI, pour produire pAM310. Des souches compétentes E.coli MC1061 ont été transformées avec le produit de ligation et les cellules ont été étalées sur un milieu Luria-Broth (LB) contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les clones portant le plasmide recombinant pAM310 ont été récupérés en vérifiant la carte de restriction du plasmide. Le fragment de 3,8 kb obtenu à partir de pAM310 par digestion avec les enzymes SmaI/DraI a été élué sur gel d'agarose à 0,8% et ligaturé par ses extrémités franches au site ScaI de pRR3 pour produire pAM320. Dans cette construction le gène Ap^R (gène de résistance à l'ampicilline) a été interrompu. Les cellules E.coli MC1061 ont été transformées et les colonies ont été sélectionnées par le phénotype Km^R Ap^S. L'ADN de ces recombinants a été préparé par lyse alcaline et utilisé pour transformer M. smegmatis mc²155 (Snapper et al, 1990, Molec. Microbiol. 4:1911-1919) par électroporation.

Figure 2 : Séquence nucléotidique du fragment BamHI/PstI de 716 bp obtenu à partir de pAM3 et les 185 acides aminés N-terminaux de orf2

SD = Shine Dalgarno; +1= site d'initiation de transcription

Figure 3 : ELISA sur des sérums de souris prélevés 40 jours après l'inoculation iv (intraveineuse)

Des souris Balb/C ont été immunisées par voie iv avec 10^7 CFU de r-BCG transformé avec pAM320, ou avec du BCG souche 1137P2. Plusieurs souris non immunisées ont été utilisées comme contrôle. Les sérums ont été prélevés 40 jours après immunisation et testés. Les anticorps anti- β -galactosidase ont été détectés par la méthode ELISA (Engval E. et Perlman P, 1971, Immunochemistry 8: 871-874). Les plaques de microtitration ont été recouvertes avec 1 μ g de β -galactosidase par puits. Les anticorps anti- β -galactosidase ont été détectés avec des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de souris marqués à la phosphate alcaline (Biosis). Chaque valeur correspond à un pool de sérums de quatre ou cinq souris.

Figure 4 : Réponse proliférative des cellules de ganglions lymphatiques d'une souris Balb/C immunisée par voie sous-cutanée avec 10^7 CFU ou r-BCG + pAM3 [], et la souche BCG 1173P2 [X]

Un groupe de souris immunisées a été inoculé avec 0,1 ml de IFA . Deux semaines plus tard, les réponses prolifératives des cellules LN (cellules de ganglions lymphatiques) à la β -galactosidase, à APH3', à la PPD et la ConA ont été testées.

Figure 5 : Prolifération des lymphocytes CD4+ et CD8+ spécifiques

Des souris Balb/C ont été immunisées par voie sous-cutanée avec 10 CFU de BCG 1173 P2 (a) et r-BCG + pAM320 (b). Deux semaines plus tard les réponses prolifératives de leurs cellules LN à la PPD (10 µg/ml) (a) et la β-galactosidase (0,01 µg/ml) (b) ont été testées en présence d'anticorps monoclonaux anti-CD4 (●) ou anti-CD8 (○).

Figure 6 : Réponses en interféron-gamma des cellules LN de souris

- a) souris immunisées avec le BCG 1173P2
- b) souris immunisées avec r-BCG (+ pAM320) après stimulation avec 1 µg/ml β-gal (●), 10 µg/ml PPD (○), 2,5 µg/ml con A (Δ)

Figure 7 : Clonage du promoteur Pan adjacent à lacZ

PCR sur pan

amorces :

P1 = 5' CCCTCTAGAATTCCGTGACAAGGCCGAAGAGCCCCGCGA 3'

P2 = 5' AACATATGAGATCTTCTCCTTCTGGGTGGCCGCCCC 3'

Conditions de la PCR : 35 cycles

Dénaturation 2 minutes à 95°C , appariement 2 minutes à 55°C, élongation 2 minutes à 72°C.

Volume de réaction 50 µl contenant 10 µM d'amorces, 10 nmol de dNTP, l'ADN cible de pAM3.

Figure 8 : Clonag du produit d PCR dans MCS d pSL 1180

Le produit obtenu par PCR a été digéré avec XbaI/NdeI et ligaturé au pSL 1180 (Pharmacia) digéré avec XpaI/NdeI pour donner pWR30.

Figure 9a et 9b : Description schématique de la construction de pWR31, pWR32 et pWR33

Pour les figures 7, 8, 9 et: la PCR (amplification génique) a été utilisée pour produire un fragment de 716 bp à partir de pAM3 en utilisant les amorces P1 et P2. Ce fragment contenait le promoteur pam avec les sites XbaI et EcoRI à l'extrémité 5' et les sites BglII et NdeI à l'extrémité 3'. Le fragment a été digéré avec XbaI et NdeI et cloné dans le site multiple (MCS) de pSL1180 pour former le plasmide pWR30. Lors de la préparation pour le clonage de pan en un site adjacent au gène lacZ, le promoteur pl et le gène CII ont été clonés devant le gène tronqué lacZ de pNM482. Ceci permet de générer une protéine fusion CII-LacZ fonctionnelle sous le contrôle de séquences en amont contenant pL, ainsi qu'un polylinker permettant des constructions ultérieures. Le plasmide pTG952 a également été digéré avec XhoI et son extrémité complétée avec le fragment de Klenow. Un fragment de 530 pb a ensuite été récupéré à partir du plasmide après digestion avec BamHI et cloné dans le site SmaI/BamHI de pNM482. Le plasmide résultant pIPJN possédait ainsi un gène fonctionnel de β -galactosidase sous le contrôle du promoteur pl de lambda. Afin de cloner pan dans pIPJN une digestion par EcoRI/BglII a été faite sur pWR30. Le fragment de 159 bp a été

purifié avec Geneclean et cloné dans pIpJN digéré avec EcoRI/BglII pour donner pWR31. Quand les souches E.coli ont été transformées avec ce plasmide et cultivées en présence d'ampicilline et de X-gal, des colonies bleues ont été formées. L'opéron de fusion a ensuite été récupéré à partir de pWR31 par digestion par EcoRI/DraI. Le site EcoRI a été complété avec l'enzyme de Klenow et des dNTP puis ligaturé au plasmide pRR3 digéré par l'enzyme ScaI. Les deux orientations de l'opéron dans pRR3 ont été obtenues. La transformation de E.coli et M. smegmatis avec ces deux constructions (pWR32, pWR33) a permis la formation de colonies bleues lorsque les bactéries ont été cultivées en présence de substrat chromogène de X-gal.

Figure 10: séquence de orf 2,

Figure 11: réponse en anticorps à partir de sérum d'animaux immunisés avec le r-BCG exprimant la β -galactosidase.

M A T E R I E L S E T M E T H O D E S

Souches bactériennes, phages, plasmides et milieux de cultures

M. bovis BCG (BCG) souche Pasteur 1173 P2 appelé BCG (Stover C.K. et al, Nature 351:456-460) a été utilisée en tant qu'hôte pour la construction de différents recombinants BCG (r-BCG). D'autres bactéries, phages et plasmides utilisés dans les expériences rapportées ci-après sont décrits dans le Tableau I. Le BCG a été cultivé jusqu'à la formation de voiles sur un milieu de Sauton (Sauton B., Comptes Rendus Académie des Sciences 1912:155-1860 dans Calmette A. et al, Vaccination préventive par le BCG p 811 - Ed. Masson 1928) pour réaliser une préparation vaccinnante classique ou sous forme d'une culture dispersée. Les clones bactériens de r-BCG ont d'abord été cultivés sur un milieu Lowenstein-Jensen (Jensen K., Towards a standard of laboratory methods, 4th Rep. Subcomm laboratory methods. Bull Union Internat. against Tuberc., 1957, 27:146-166) contenant 10 µg/ml de kanamycine, puis transférés sur milieu Sauton. Ces cultures ont été utilisées pour des analyses d'expression in vitro et pour l'immunisation des animaux. Les souches M. smegmatis et E.coli ont été cultivées selon la méthode décrite par Ranes et al (1990) J. Bact. 172: 2793-2797.

Préparation de l'ADN de M. paratuberculosis

50 mg de souches M. paratuberculosis lyophilisées (Murray A. et al, NZ Vet Journal précité) ont été resuspendues dans un tampon d'homogénéisation (NaCl 0,1M, Tris-HCCL 0,03M, pH 7,5, EDTA 0,006M), mélangées

avec 2 ml de billes de verre (diamètre 0,45-0,5 mm) et agitées dans un homogénéiseur à rotation Braun à la vitesse maximum pendant 2 minutes à 4°C. Après la centrifugation et l'extraction au phénol/chlorophorme, l'ADN a été précipité avec 95% d'éthanol et traité avec 0,1 mg/ml de DNase sans de RNase. Après une autre extraction au phénol/chlorophorme, et une précipitation à l'éthanol, l'ADN a été resuspendu dans l'eau (A260/280 ratio = 1,8).

Construction de la banque de gènes de M. paratuberculosis

La méthode utilisée était fondée sur les protocoles décrits par Young et al (Proc. Natl. Acad. Sci. (1985) 82: 2583-2587) modifiées par Murray et al (NZ Vet. J. (1989) 37: 47-50). La banque contenait $2,2 \cdot 10^5$ bactériophages recombinants. Après amplification dans E.coli Y1090, les recombinants représentaient approximativement 85% et correspondaient à un titre de $3 \cdot 10^{11}$ PFU/ml.

Criblage de la banque lambda gt11 de M. paratuberculosis

La banque a été criblée par hybridation différentielle de l'ADN obtenu par transfert sur membrane à partir des boîtes de pétri contenant les phages de lyse (Young et al précité) en utilisant l'ADN chromosomique complet de M. paratuberculosis (Mptb) et de M. phlei à titre de sondes. Le bactériophage recombinant qui a donné un signal positif après hybridation avec l'ADN de Mptb mais n'a pas hybridé avec M. phlei a été conservé pour des analyses

ultérieures. Il a été propagé en utilisant la méthode de lysat sur plaque telle que décrite par Maniatis et al (J. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y. (1982)).

Manipulation de l'ADN

Les fragments d'ADN ont été séparés sur gels d'agarose à 0,8% ou 1% contenant 0,5% de bromure d'éthidium. L'ADN a été élué à partir des gels et purifié en utilisant le kit Geneclean II (Bio101 Inc La Jolla) selon les indications du fabricant.

Le clonage des fragments dans des plasmides et la transformation de E.coli ont été réalisés en utilisant les techniques standard de Maniatis et al publication précitée. La transformation de mycobactéries a été réalisée selon la description de Ranes et al précité.

Détermination de la séquence nucléotidique

L'ADN a été coupé au hasard par sonication et les fragments ont été clonés en aveugle dans M13. Les clones ont été séquencés par la méthode dideoxy de terminaison de chaîne en utilisant le kit sequenase (USB) et le 7-deaza-dGTP, analogue du dGTP. Des chevauchements et l'analyse des données de séquences à partir des fragments obtenus au hasard ont été effectués en utilisant les programmes d'ordinateur décrits par Staden et al (Nucleic Acids Res. (1986) 14: 217-231).

Préparation de l'ARN

Une culture de 100 ml de souches M. smegmatis MYC760 a été cultivée jusqu'à la phase de mid-log dans un milieu 7H9, complété avec un enrichissement ADC Middlebrook (Difco) plus 25 µg/ml de kanamycine à 37°C. Les cellules ont été collectées après centrifugation, lavées avec le même milieu de croissance frais et resuspendues dans un milieu contenant 1% (p/v) de sulphonate de sodium triisopropylnaphthalene, et 6% (p/v) de 4-amino salicylate de sodium. 14 g de billes de verre (4,5-5,5 mm) ont été ajoutés le mélange a été agité vigoureusement dans un appareil vortex pendant deux fois 2 minutes. Le surnageant a été extrait deux fois avec du phénol/chlorophorme et les acides nucléiques à l'intérieur de la phase aqueuse ont été précipités avec du propan-2-ol, en présence d'acétate de sodium 0,3 M à pH 6. Après la centrifugation pendant 10 minutes à 8000 rpm, le culot de centrifugation a été lavé avec 100% d'éthanol, séché à température ambiante pendant 10 minutes, et resuspendu dans 1 ml d'eau distillée traitée avec du DEPC. L'ARN a été précipité en présence de trois volumes d'acétate de sodium 4 M (pH 6) à -20°C pendant 18 heures, collecté par centrifugation et resuspendu dans de l'eau distillée (densité optique DO 260/280 2,0). L'ARN a été conservé à -20°C sous forme d'un précipité dans le propan-2-ol.

Cartographie des transcripts

Le plasmide pAM311 a été linéarisé avec BssHII pour produire des extensions 5', et déphosphorylé avec de la phosphatase alcaline d'intestin de veau. Après purification du plasmide avec le kit Geneclean, l'ADN a été coupé avec l'enzyme de restriction PstI et le

fragment de 3,1 kb a été isolé à partir du gel d'agaros 1%. L'extrémité 5' hydroxyle a été radiomarquée avec de l'ATP (γ - ^{32}P) (activité spécifique 3000 Ci/nmol) en utilisant la polynucléotide kinase (10 unités). Le marqueur non incorporé a été retiré par passage à travers une colonne Nick (Pharmacia).

L'ARN (40 μg) et la sonde d'ADN radiomarquée (0,1 μg) ont été mélangés dans un volume total de 30 μl d'eau distillée, 240 μl de formamide déionisé ont été ajoutés et le mélange a été chauffé à 100°C pendant 3 minutes. Après refroidissement rapide sur la glace, 30 μl de tampon d'hybridation 10 X (0,2 M PIPES-NaOH, pH 6,4, NaCl 4M, EDTA 20mM) a été ajouté et l'incubation a été poursuivie à 60°C pendant 3 heures. Les hybrides ADN/ARN ont été précipités avec trois volumes d'éthanol à -20°C pendant 16 heures. Après la centrifugation pendant 15 minutes à 4°C, le culot d'acide nucléique a été resuspendu dans 100 μl de tampon contenant de l'acétate de sodium 50 mM à pH 4,6, du NaCl 280 mM du ZnCl_2 5 mM et 20 μg par ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. 2 μl de nucléase S1 (472 unités) ont ensuite été ajoutés et la digestion a été poursuivie pendant 30 minutes à 20°C. La réaction a été arrêtée par addition de 25 μl d'une solution contenant du $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 2,5 M et de l'EDTA 50 mM à pH 8. Les hybrides ADN/ARN ont précipité avec du propan-2-ol en présence de 1 μg d'ADN porteur (carrier) (ADN de sperme de saumon dénaturé). Après un lavage dans 80% d'éthanol, le culot a été resuspendu dans 5 μl d'eau distillée et 7 μl de solution stop (95% v/v formamide, EDTA 20mM, 0,05% bleu de bromophénol, 0,05% Xylene cyanol FF). Le mélange a été chauffé à 100°C pendant 5 minutes et ensuite chargé sur un gel de séquençage à 6% de polyacrylamide.

Tests sérologiques

Des sérums murins ont été testés par ELISA pour détecter des anticorps spécifiques dirigés contre la β -galactosidase selon la technique suivante : des plaques microtitrées à 96 puits (Nunc) ont été recouvertes avec 10 μ g/ml de β -galactosidase purifiée dans du tampon PBS pendant 1 heure à 37°C et pendant 16 heures à 4°C. Après lavage trois fois avec du PBS contenant 0,1% de Tween 20, les sérums préabsorbés avec les extraits de BCG pendant 16 heures à 4°C ont été ajoutés aux puits dans un tampon de dilution (PBS + 0,1% de Tween 20, 1% de BSA) pendant 2 heures à 37°C. Après trois lavages, les titres en anticorps ont été déterminés par photométrie à 405 nm en utilisant une IgG de lapin anti-souris conjuguée à de la phosphatase alcaline (Biosys, Compiègne) et 1 mg/ml de phosphate de p-nitrophenyl à titre de substrat.

Test β -galactosidase

L'activité β -galactosidase a été mesurée dans des cellules E.coli traitées avec du toluène et dans des extraits de M. smegmatis soumis à un traitement aux ultrasons de selon la description de Cossart et al (J. Bacteriol. (1985) 161: 454-457).

Immunisation des animaux

Des souris femelle Balb/c, âgées de 6 semaines ont été obtenues de Iffa Credo. De façon à suivre les réponses immunitaires cellulaires, les souris ont été inoculées par voie sous-cutanée (SC) à la base de la queue avec 10^7 unités formant des colonies (CFU) de souches de BCG. Les cellules des ganglions lymphatiques

ont été prélevées 14 jours après l'immunisation et les réponses prolifératives ont été étudiées. Un groupe contrôle de souris a reçu de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) dans une solution saline. Pour suivre la production d'anticorps, un groupe de souris a été inoculé par voie intraveineuse (iv) avec 5.10^6 CFU des souches de BCG. Certaines souris ont subi un rappel de l'inoculation intraveineuse, trois fois à 21 jours d'intervalle avec 10^6 CFU ; les échantillons de sérum ont été prélevés 28 jours après l'immunisation et 14 jours après chaque rappel pour titrer les anticorps.

La stabilité des différentes souches de BCG a été analysée par détermination du nombre de CFU BCG récupérées à partir de la rate deux mois après l'inoculation (iv) de 10^7 CFU de BCG.

Réponses prolifératives aux antigènes spécifiques

14 jours après l'immunisation, les suspensions cellulaires ont été préparées à partir des ganglions lymphatiques inguinaux (LN) prélevés à partir de trois souris et resuspendus dans du RPMI1690 (Gibco) contenant de la L-glutamine 2 mM, de la gentamicine 50 $\mu\text{g/ml}$, 5.10^5 M 2-mercaptoethanol et 10% de sérum de veau fœtal (FCS). Les cellules LN ont été cultivées à une concentration de 4.10^5 cellules par puit dans des plaques de culture à fond plat contenant 96 puits (Corning) en présence d'un antigène approprié. La concentration des antigènes utilisés était la suivante : 0,01 $\mu\text{g/ml}$ de APH3' et β -galactosidase et de 10 $\mu\text{g/ml}$ d'un dérivé de protéine purifiée (PPD). A titre de contrôle de réaction positive non spécifique, la concanavaline A (ConA) a été ajoutée à une concentration de 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Certaines suspensions

cellulaires sont restées non stimulées; Chaque test a été réalisé en trois exemplaires. Les cultures ont été incubées pendant cinq jours à 37°C, les dernières 22 heures en présence de thymidine méthyl tritiée (3H dThd 1mCi = 37KB2 Amersham) 0,4 uci/puit dans une atmosphère d'air humidifié contenant 7% de CO₂. Les cellules ont ensuite été récoltées sur des filtres en fibre de verre (Automash 2000 Dynatch) et la radioactivité incorporée a été mesurée. Les résultats sont exprimés en fonction des coups par minute (cpm) moins le bruit de fond. Les erreurs standard de la moyenne pour les cultures en tripticat ont été déterminées. Les valeurs du bruit de fond des cultures contrôle non stimulées étaient inférieures à 10⁴ cpm.

Anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8

Afin de déterminer le ratio du sous-groupe de cellules T impliquées dans la prolifération, des anticorps monoclonaux contre les sous-groupes de cellules T ont été ajoutés aux cultures de cellules LN à différentes concentrations. Le L3T4 (CD4+) hybridome GK 1-5 de rat anti-souris CD4+ spécifique et LYT2 (CD8+) (hybridome H35 17-2 de rat anti-souris CD8+ spécifique) ont été produits selon la méthode décrite par (Dialynas D.P. et al, 1984, J. of Immunology Tome 31, p 2445-2451). En bref pour obtenir des ascites d'anticorps monoclonaux, des souris nude ont été inoculées une première fois avec des cellules correspondant à 10⁶ hybridomes. Les anticorps ont été collectés par précipitation dans le sulfate d'ammonium. La quantité de protéines a été testée par densité optique à 280 nm.

Mesure des cytokines

La synthèse d'interféron-gama a été mesurée dans le surnageant des cultures de cellules LN à la fin du test de prolifération. Le niveau d'interféron-gama a été déterminé par un test immunoenzymatique en phase solide en utilisant le principe du sandwich multiple (Genzyme). Le surnageant a été dilué (1/2-1/10). L'interféron-gama standard a été dilué pour obtenir des valeurs à l'intérieur de l'intervalle linéaire du test (128-8200 pg/ml).

R E S U L T A T S

Isolement et caractérisation des bactériophages recombinants

Une banque génomique lambda gt11 a été construite pour isoler des séquences spécifiques de M. paratuberculosis (Mptb). Un phage recombinant qui hybridait fortement avec l'ADN chromosomique de Mptb mais pas avec l'ADN de M. phlei a été repris individuellement et utilisé pour préparer les stocks de lysats de phages (Maniatis et al précité). L'un de ces recombinants a été sélectionné au hasard pour des tests supplémentaires. Son génome contient une insertion de 3,8 kb. L'ADN de mycobactéries a été récupéré à partir de ce fragment par digestion avec les enzymes de restriction EcoRI et BamHI. Ceci a conduit à l'obtention de quatre fragments qui ont été séparés sur gel d'agarose. L'un de ces fragments, de 1,6 kb, a été élué à partir du gel et ligaturé au plasmide pGEM-2 digéré par EcoRI/BamHI. Des cellules compétentes de E.Coli DH5 alpha (Bethesda Research Laboratories,

Gaithersburg MD USA) ont été transformées avec le mélange de ligation selon les instructions du fabricant puis ont été appliquées sur des plaques avec un milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Une seule colonie a été sélectionnée et utilisée pour préparer une quantité suffisante du plasmide recombinant qui a été désigné par pAM3, en utilisant la technique standard décrite par Maniatis et al précité.

Lorsque pAM3 a été marqué avec le kit de sonde chimique (Promega) et utilisé en tant que sonde dans un test dot-blot, l'hybridation s'est produite uniquement avec l'ADN extrait de M. paratuberculosis. Les différents isolats de Mptb testés incluaient la souche type M. paratuberculosis, des isolats de 23 Mptb d'origine bovine, ovine et caprine et un isolat d'un patient humain présentant la maladie de Crohn. Le plasmide pAM3 n'a pas hybridé avec M. avium serovar 2 et 3, M. intracellulare, M. tuberculosis souche H37Rv, M. bovis, M. phlei, M. smegmatis ou N asteroides.

Analyse de séquence

La séquence nucléotidique du fragment BamHI/PstI de 716 bp est reportée à la figure 2. L'analyse de la séquence pour rechercher les signaux consensus pour le début de la transcription et de la traduction a permis de montrer une région potentielle à -35 (position 83-88) une région à -10 (position 106-111) et une séquence de Shine Dalgarno (SD) à la position 147-152. Une longue phase ouverte de lecture (ORF) désignée par ORF2 suit la séquence SD avec un codon d'initiation ATG en position 160. L'analyse de la séquence nucléotidique du fragment a révélé une homologie avec l'élément d'insertion IS900 M. paratuberculosis. Le segment

153-716 était identique à la séquence nt1451 à 888 de IS900 (Green et al (1989) Nucl. Acids. Res. 17: 9063-9073). ORF2 est dans la direction opposée à la transcription de la transposase potentielle de cet élément, orf1197. Le segment 1-152 est en dehors de la séquence de IS900.

orf2 ne présente pas de similitude avec d'autres séquences si l'on se reporte aux séquences contenues dans les bases de données. Lorsque IS900 est utilisé comme sonde génomique pour des tests de Southern blot de différents isolats de Mptb, des schémas de bandes multiples presque identiques sont obtenues, indépendamment de l'origine des isolats (McFadden et al (1987) J. Clin. Microbiol. 25: 796-801). Cette absence de polymorphisme suggère que IS900 s'intègre de façon prédominante au niveau de sites spécifiques à l'intérieur du génome de Mptb. Un nombre limité de séquences adjacentes à la terminaison de IS900 ont été rapportées, il semble contenir des séquences nucléotidiques conservées (Green et al (1989) Nucl. Acids Res. 17: 9063-9073). La séquence de Shine Dalgarno (SD) AAGGAG présentée à la figure 2 est adjacente à l'élément IS. La séquence inverse complémentaire de cette séquence SD (CTCCTT) est identique à la séquence flanquante rapportée pour IS900 contenue dans le clone pMB22 dérivé de la banque génomique de l'isolat humain provenant d'un patient malade de la maladie de Crohn de Mptb.

Analayse et expression de ORF2

Pour étudier l'expression de ORF2 à un niveau transcriptionnel et traductionnel, le fragment BamHI/PstI de 716 bp de pAM3 a été cloné dans entre les

sites BamHI et PstI du fragment contenant plusieurs sites de clonage (MCS) du plasmide pNM482 (Minton et al (1984) Gene 31: 269-273). Le MCS est adjacent d'un gène tronqué de β -galactosidase (lacZ) dépourvu de ses 8 premiers acides aminés terminaux et de ses signaux de départ de transcription et de traduction. L'introduction d'un segment correctement aligné contenant des signaux de régulation appropriés et une séquence en aval codante, permet la formation d'un gène hybride qui confère le phénotype LacZ⁺. orf2 était en phase relativement au gène lacZ dont la construction décrite plus haut et le produit de traduction auraient dû pouvoir être exprimés sous forme d'une protéine de fusion orf2- β -galactosidase contenant 185 acides aminés de orf2. Cependant la transformation de E.coli MC1061 n'a pas produit de colonies transformées par Lac⁺. L'expression du gène de fusion orf2-lacZ dans un système mycobactérien a été étudiée. En conséquence le fragment de 3,8 kb SmaI/DraI contenant le gène de fusion a été ligaturé sous forme de fragment à extrémité franche, au site ScaI du plasmide pRR3, plasmide navette entre les mycobactéries et E.coli pour produire pAM320. La transformation de M. smegmatis avec ce plasmide par électroporation suivie d'une culture en présence de kanamycine et de X-gal a conduit à l'obtention de colonies bleues apparaissant dans les trois jours. Une expérience similaire pour transformer le BCG avec ce plasmide a également permis d'obtenir des colonies bleues qui sont apparues approximativement dans les 21 jours. Ainsi orf2 a pu être exprimé sous forme d'une protéine de fusion avec la β -galactosidase.

Afin de quantifier l'expression de orf2, le niveau d'activité de la β -galactosidase a été mesuré dans M. smegmatis et dans E.coli transformés avec pAM320 ou

avec pRR3. Les résultats sont donnés dans le tableau III. 250 unités ont été trouvées dans M. smegmatis transformée avec pAM320 hébergeant le gène de fusion orf2-lacZ mais aucune activité trouvée dans la souche M. smegmatis transformée avec pRR3. Dans les souches E.coli transformées avec pAM320, un faible niveau d'activité a seulement été trouvé (5/7 unités). Ces résultats montrent que la fusion orf2-lacZ n'est pas exprimée dans E.coli et suggère que orf2 doit être spécifiquement exprimé dans les mycobactéries.

Analyse de transcription

Le site de départ de la transcription du gène de fusion orf2-lacZ à l'intérieur de pAM320 a été déterminé par cartographie haute résolution avec la nucléase S1. Les expériences ont démontré que le site de départ de la transcription de la séquence est situé en amont de orf2 à la position 119 (figure 4). Un second site de démarrage est présent à l'extérieur de la séquence de mycobactéries. Deux explications peuvent être trouvées à cette observation. Tout d'abord ceci peut être dû à une hybridation de la sonde avec une petite quantité de plasmide navette qui a été co-précipité pendant la préparation de l'ARN, sinon ceci peut être dû à la lecture des résultats de transcription par l'intermédiaire du gène de résistance à l'ampicilline de pRR3. Ces résultats ainsi que l'expression de la protéine de fusion avec la β -galactosidase indiquent que l'élément promoteur Pan qui est adjacent à l'élément IS900 est capable de contrôler l'expression de orf2. Il s'agit là de la première démonstration de l'induction de l'expression d'un gène

localisé à l'intérieur d'une séquence d'insertion, au moyen d'un promoteur chromosomique adjacent.

Construction de l'opéron de fusion orf2-lacZ

Afin de caractériser de façon plus précise l'activité du promoteur pan, orf2 a été délété et un opéron de fusion avec le gène lacZ a été construit (figures 7, 8, et 9).

pWR32 et pWR33 sont des recombinants de pRR3 contenant la fusion pan-LacZ dans les deux orientations (figure 9). La transformation soit de E. coli soit de M. smegmatis avec ces constructions, suivie d'une culture en présence de kanamycine et de X-gal a conduit à l'obtention de colonies bleues pour les deux espèces de bactéries. Ainsi pan est fonctionnel dans E.coli lorsqu'il est présent dans un opéron de fusion avec Lac-Z mais il n'est pas fonctionnel lorsqu'il est présent dans un gène de fusion avec orf2.

pWR32 a induit le même niveau d'activité β -galactosidase dans M. smegmatis que pAM320. Cependant le niveau d'activité avec pWR33 était 10 fois plus fort dans E.coli. Ceci doit être dû à l'activité constitutive d'un promoteur en amont du gène de fusion pAM-lacZ.

Réponse immunitaire cellulaire spécifique

Des souris Balb/c ont été inoculées par voie sous-cutanée avec des recombinants BCG hébergeant le plasmide pAM320 exprimant la phosphotransférase APH3' sous le contrôle de sa propre région de régulation et lacZ sous le contrôle de pan. Les réponses

prolifératives des cellules LN prises 14 jours après l'immunisation ont été analysées. Une réponse spécifique à une stimulation in vitro avec différents antigènes a été observée (figure 4). Seules les cellules LN de souris immunisées avec r-BCG exprimant lacZ et APH3' ont proliféré en réponse à une stimulation in vitro par la β -galactosidase et par l'aminoglycoside phosphotransférase (APH3'). La prolifération cellulaire en réponse à un extrait de PPD (Protein Purified Derivative) a été similaire avec les cellules LN des souris immunisées avec la souche BCG non recombinante. Les cellules LN des animaux non immunisés ont proliféré uniquement en réponse à ConA. Cette prolifération non spécifique était du même ordre d'amplitude dans tous les groupes d'animaux.

On a démontré que les cellules T CD4+ et CD8+ sont impliquées dans les réponses prolifératives décrites plus haut par l'inhibition alternative de la prolifération, avec des anticorps monoclonaux anti-CD4+ et anti-CD8+. Les résultats apparaissent à la figure 5. Une inhibition de 70% de la réponse spécifique à la β -galactosidase est observée après l'addition d'anticorps anti-CD4 aux cultures de cellules LN. Dans des expériences similaires, une inhibition de 30% a été observée après addition des anticorps anti-CD8 aux cultures. Ces résultats montrent que la plus forte réponse est obtenue par le sous-groupe des cellules T CD4+. Deux populations différentes de cellules T CD4+ participent à la régulation de la réponse immune chez les souris. Un sous-groupe de cellules T CD4+ désigné par TH1 produit de l'interleukine-2 (IL2) et de l'interferon-gama et active préférentiellement les macrophages pour tuer ou pour inhiber la croissance intracellulaire de l'agent pathogène. Un autre sous-

groupe de cellules T CD4+ qui est désigné par TH2 produit d'autres lymphokines incluant l'IL4, l'IL5, et est impliqué dans l'induction des réponses humorales. Une production significative d'interferon-gama a été détectée dans le surnageant des cultures de cellules LN stimulées avec des antigènes spécifiques (figure 6). Ces valeurs étaient légèrement plus basses que celles obtenues après la stimulation avec PPD ou conA. Cependant elles restent significatives puisque la valeur plancher des courbes standard était 100 pg/ml. La production d'interferon-gama par les cellules LN isolées à partir des animaux immunisés avec du BCG non recombinant a été uniquement observée après stimulation in vitro avec du PPD ou ConA.

Réponse en anticorps

Du sang a été prélevé quatre semaines après l'inoculation intraveineuse avec les deux souches de BCG et 14 jours après chacun des rappels iv. Les anticorps dirigés contre la β -galactosidase ont été détectés par un test ELISA à partir de sérums d'animaux immunisés avec le r-BCG, exprimant la β -galactosidase (figure 3). Une augmentation de la réponse en anticorps a été observée après les différents rappels. Les résultats apparaissent sur la figure 11. Une augmentation importante du taux d'anticorps est observée après le premier puis le deuxième rappel. Un troisième rappel ne provoque pas d'augmentation du taux d'anticorps. Les anticorps dirigés contre la β -galactosidase sont détectés dans les sérums d'animaux immunisés avec du BCG non recombinant. Cette réponse est beaucoup plus faible que la réponse induite par r-BCG exprimant la β -galactosidase et peut être due à une

activation polyclonale par le BCG. Aucun anticorps n'a été détecté chez les souris non immunisées. Ces résultats démontrent que la réponse humorale peut être déclenchée par le r-BCG exprimant un antigène étranger (hétérologue) sous le contrôle de pan. La β -galactosidase a été choisie comme système modèle mais elle peut être remplacée par tout type d'antigène intéressant à des fins de vaccination.

Stabilité in vivo des différentes souches de r-BCG

Les bacilles de BCG ont été récupérés à partir d'homogénats de rate deux mois après l'inoculation i.v. Le tableau II montre que les différents clones r-BCG utilisées dans cette étude ont un comportement similaire à celui de la souche de BCG non recombinant. Après étalement des souches r-BCG sur des milieux contenant de la kanamycine et X-gal $2,0.10^5$ CFU bleues ont été obtenus par comparaison avec $7,4.10^5$ CFU après culture dans un milieu en l'absence de sélection par la kanamycine. Donc environ 27% de la population r-BCG est stable après deux mois de croissance in vivo. Cette proportion doit permettre la multiplication et la persistance du BCG dans les macrophages de l'organe cible, qui sont requises pour une stimulation immunogène à long terme.

Conclusion

Les résultats présentés ici démontrent que les souches de r-BCG hébergeant des plasmides codant pour APH3' sous sa propre région de contrôle et la β -galactosidase sous le contrôle de pan peuvent déclencher des réponses immunitaires cellulaires et

humorale, spécifiques de ces antigènes, chez la souris. Ces antigènes polypeptidiques sont localisés dans le cytoplasme de r-BCG. Comme on l'a déjà décrit pour le BCG, les dérivés de r-BCG doivent se multiplier à l'intérieur des macrophages et présenter les peptides de la β -galactosidase en association avec les molécules du CMH. Ceci conduit à la reconnaissance par les lymphocytes T qui répondent en proliférant. Les cellules LN ont montré une forte prolifération en réponse à une stimulation in vitro. Les cellules T CD4+ et CD8+ se sont avérées impliquées dans la réponse proliférative avec un pourcentage de 70% de cellules CD4+ et 30% de cellules CD8+. La production d'inféron-gamma suggère un rôle efficace du sous-groupe de cellules TH1. Ces cellules sont responsables de l'activation des macrophages requise pour l'élimination des agents pathogènes intracellulaires. Les titres en anticorps trouvés suggèrent également la coopération du sous-groupe de cellules T désigné par TH2 qui joue un rôle dans l'induction des réponses humérales.

Le fait que 27% de ces souches r-BCG sont récupérées sans réarrangement majeur, après deux mois de croissance in vivo chez les souris suggère qu'elles vont permettre l'induction d'une réponse immune à mémoire. Le clonage ultérieur des antigènes sur le chromosome en utilisant différentes méthodologies telles que la transposition, la recombinaison homologue, l'intégration médiée par un phage ou un plasmide permettront la construction de souches de r-BCG ayant une stabilité encore plus satisfaisante et induisant des réponses immunes plus persistantes à long terme dues à une stimulation continue.

Tableau I

Souches bactériennes, phages et plasmides

<u>Bactéries</u>	<u>Description</u>	<u>Source ou Référence</u>
<u>M. paratuberculosis</u>	Souche bactérienne isolée chez un bovidé ayant la maladie de Johnes	Université de Massay Nouvelle Zélande
<u>M. smegmatis mc²155</u>	Mutant de mc ⁶ à haute efficacité de transformation	Snapper et al
<u>M. bovis BCG</u>	Souche Pasteur BCG 1173P2	Institut Pasteur Paris
<u>E.coli Y1090</u>	Souche réceptrice pour lambda gt11	Commercialisé par Promega
<u>E.coli MC1061</u>	Souche réceptrice pour la transformation par les plasmides se répliquant chez <u>E.coli</u>	Maniatis et al
<u>E.coli DH5α</u>	Souche réceptrice pour la transformation par les plasmides se répliquant chez <u>E.coli</u>	Maniatis et al
<u>Phage</u>		
<u>Mptq lambda gt11</u>	Banque d'ADN génomique de <u>Mptb</u>	Murray et al
<u>pUC₁₈</u>	Vecteur à nombre de copies élevé	Murray et al

Souches bactériennes, phages et plasmides

(suite)

Bactéries	Description	Source ou Référence
pGEM-2	Vecteur plasmidique à nombre de copies élevé	Commercialisé par Promega
pNM482	Vecteur pour la détection de promoteur	Minton et al
PRR3	Vecteur navette <u>E.coli</u> -mycobactérie	Ranes et al
pAM-3	Recombinant pGEM-2 contenant un fragment <u>EcoRI</u> / <u>BamHI</u> de 1,6 kb de <u>Mptg</u>	Décrit dans le texte
pAM310	Recombinant pNM482 contenant un fragment <u>BamHI</u> / <u>PstI</u> de 716 bp de pAM-3	Décrit dans le texte
pAM320	Recombinant pRR3 contenant un fragment <u>DraI</u> / <u>SmaI</u> de 3,8 kb de pAM310	Décrit dans le texte
pAM311	Recombinant pUC ₁₈ contenant un fragment <u>BamHI</u> / <u>PstI</u> de 716 bp de pAM-3	Décrit dans le texte
pAM312	Recombinant pUC ₁₈ contenant un fragment <u>EcoRI</u> / <u>BamHI</u> de 1,6 kb de <u>Mptg</u>	Décrit dans le texte

Souches bactériennes, phages et plasmides

(suite)

Bactéries	Description	Source ou Référence
PSL 1180	Dérivé de pUC ₁₈	Pharmacia
pWR30	Recombinant pSL 1180 contenant le produit de digestion par PCR de <u>XbaI</u> / <u>NdeI</u> (168 bp)	Décrit dans le texte
pTGT 959	Plasmide contenant le promoteur PL de lambda	Transgene
pIpJN1	Recombinant pNM482 contenant le fragment <u>XhoI</u> / <u>BamHI</u> de pTG 959	Décrit dans le texte
pWR31	Recombinant pIpJN contenant le fragment <u>EcoRI</u> / <u>BlqII</u> de pWR30 (159 Bp)	Décrit dans le texte
pWR32 + pWR33	Recombinants pRR3 contenant le fragment <u>EcoRI</u> / <u>DraI</u> (3,8 kb) de pWR31 dans les 2 orientations	Décrits dans le texte

Tableau II**Stabilité in vivo de r-BCG (+ pAM320)**

**BCG CFU's récupéré à partir d'homogénats de
moëlle osseuse murine, 2 mois après l'inoculation IV
avec 10^7 CFU Kan-Kanamycine**

r-BCG (+pAM320) Clone	Milieu de Culture 7H11	Milieu de Culture 7H11 + Kan + X-gal
39.3	759000	199000
39.4	720000	194000
BCG 1137P2	740000	0

Tableau IIIActivité β -galactosidase (unités/mg*)

Organisme hôte recombinant

Plasmide	<u>M. smegmatis</u>	<u>E.coli</u>
pRR3	0	N.D
pAM320	250	5-7
pWR32	250	350
pWR33	350	2500

* Poids sec, déduit à partir de la densité optique à 600 nm (1 mg [poids sec] par ml = 3,7 unités de densité optique à 600 nm)

N.D = non donné

R E V E N D I C A T I O N S

1. Séquence nucléotidique susceptible de permettre l'expression dans un hôte cellulaire d'un enchaînement nucléotidique donné, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence I choisie parmi :

- a) la séquence suivante ou toute partie de cette séquence susceptible d'intervenir dans l'expression d'un acide nucléique qui serait placé sous son contrôle,

GAT CCC GTG ACA AGG CCG AAG AGC CCG CGA CCG TGC GGT CGT CGA CGA
CCG AGT GTG AGC AGA CCC CCT GGT GAA GGG TGA ATC GAC AGG TAC ACA
(-35)
CAG CCG CCA TAC ACT TCG CTT CAT GCC CTT ACG GGG GGC GGC CAA CCC
(-10) +1
AGA AGG AGA TTC TCA ATG ACG TTG TCA AGC CGC CGC GGT AGT GGT TGC
SD
GGG GTG GTA GAC AGC GTG GTC GCG CAG CAT GGC CCA CAG GAC GTT GAG
GCG GCG GCG GGC CAG GGC GAG GAC GGC TTG GGT GTG GCG TTT TCC TTC
GGT GCG TTT TCG GTC GTA GTA GGT GCG CGA GGA GGG GTC GGT GCG GAT
GCT GAC CAA GGC CGA CAG GTA GCA GGC GCG CAG CAG GCG CCG GTC GTA
GCG TCG GGG GCG TTT GAG GTT TCC GCT GAT GCG GCC GGA ATC TCG TGG
TAC CGG CGC CAG GCC GGC GAC GCC GGC GAG GCG GTC GGC GGA GGC GAA
TGC GGC CAT GTC CCC GCC GGT GGC GGC GAG GAA CTC AGC GCC CAG GAT
GAC GCC GAA TCC GGG CAT GCT CAG GAT GAT TTC GGC GTG GCG GTG GCG
GCG AAA TCG CTC CTC GAT CAT CGC GTC GGT GTC GCC GAT TTC GGT GTC
GAG GGC CAT CAC CTC CTT GGC CAG GCG GGC CAC CAC AGT GGC CGC CAG
TTG TTG GCC GGG CAC GAT GCT GTG TTG GGC GTT AGC GGC CTG CA

b) une séquence hybridant avec la séquence complémentaire de la séquence a).

2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence II choisie parmi :

a) la séquence nucléotidique suivante ou toute partie de cette séquence contenant le site d'initiation de la transcription (position +1) et des éléments nécessaires à la reconnaissance et à la fixation des ARN polymérases d'un hôte cellulaire déterminé qui serait transformé par cette séquence, ces éléments comprenant en particulier les séquences [TAC ACT] en position -10 par rapport au site d'initiation de transcription et [TC GAC A] en position -35 par rapport à ce site :

GAT CCC GTG ACA AGG CCG AAG AGC CCG CGA CCG TGC GGT CGT

CGA CGA CCG AGT GTG AGC AGA CCC CCT GGT GAA GGG TGA ATC

+1

GAC AGG TAC ACA CAG CCG CCA TAC ACT TCG CTT CAT GCC CTT

ACG GGG GGC GGC CAA CCC AGA AGG AGA TTC TCA

b) une séquence hybridant avec la séquence complémentaire de la séquence a).

3. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2, susceptible de permettre l'expression dans un hôte cellulaire d'un enchaînement nucléotidique donné, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence III choisie parmi :

a) la séquence nucléotidique suivante :

TC GAC AGG TAC ACA CAG CCG CCA TAC ACT TCG CTT CA

b) une séquence hybridant avec la séquence complémentaire de la séquence a),

- c) toute partie de cette séquence intervenant dans l'activité de transcription d'un acide nucléique.
4. Séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'au moins la séquence comprise entre les positions +2 et +41 par rapport au site d'initiation de transcription, est remplacée pour tout ou partie, par une séquence exogène par rapport à la séquence présente naturellement en aval de la séquence III selon la revendication 3, cette séquence exogène comportant une séquence de Shine Dalgarno.
5. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et au moins une séquence d'acide nucléique, dont on souhaite obtenir le clonage et/ou l'expression dans un hôte cellulaire déterminé, sous le contrôle de ce promoteur.
6. Séquence recombinante selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'au moins une séquence d'acide nucléique à exprimer, placée sous le contrôle de la séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, code pour un peptide ou un polypeptide immunogène ou susceptible d'être rendu immunogène.
7. Séquence recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique à exprimer code pour un peptide ou un polypeptide d'un rétrovirus HIV, par exemple un peptide ou un polypeptide d'enveloppe, ou un peptide ou un polypeptide Nef, de HIV-1 ou de HIV-2.
8. Séquence recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique à exprimer est une séquence codante de mycobactérie, de préférence une séquence

codant pour des protéines impliquées dans la virulence ou des antigènes à potentiel protecteur.

9. Séquence recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisée en ce que la séquence d'acide nucléique à exprimer code pour un ou plusieurs épitopes déterminés.

10. Séquence nucléotidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 est placée en phase, en amont de la séquence d'acide nucléique à exprimer.

11. Séquence nucléotidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisée en ce que la séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et la ou les séquence (s) d'acide nucléique à exprimer constituent un opéron de fusion.

12. Séquence nucléotidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 à 10, caractérisée en ce que le promoteur et la ou les séquence (s) d'acide nucléique à exprimer constituent un gène de fusion.

13. Utilisation d'une séquence selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 pour le clonage et/ou l'expression de séquences d'acide nucléique, dans un hôte cellulaire différent de Mptb, en particulier chez des Actinomycètes et notamment chez M. bovis par exemple chez la souche avirulente BCG, chez des bactéries Gram-négatives telles que E.coli ou chez des bactéries Gram-positives telles que B. subtilis.

14. Vecteur de clonage et/ou d'expression, de type intégratif ou de type réplcatif, caractérisé en ce qu'il comprend, en un site non essentiel respectivement pour son intégration ou pour sa réplcation, une

séquence nucléotidique selon l'un quelconque des revendications 1 à 4.

15. Vecteur de clonage et/ou d'expression, de type intégratif ou de type réplcatif, caractérisé en ce qu'il est modifié en un site non essentiel respectivement pour son intégration ou pour sa réplcation, par une séquence nucléotidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 à 12.

16. Vecteur selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une partie de la séquence de Mptb désignée par ORF2, en aval de la séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

17. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide, d'un transposon ou d'un phage.

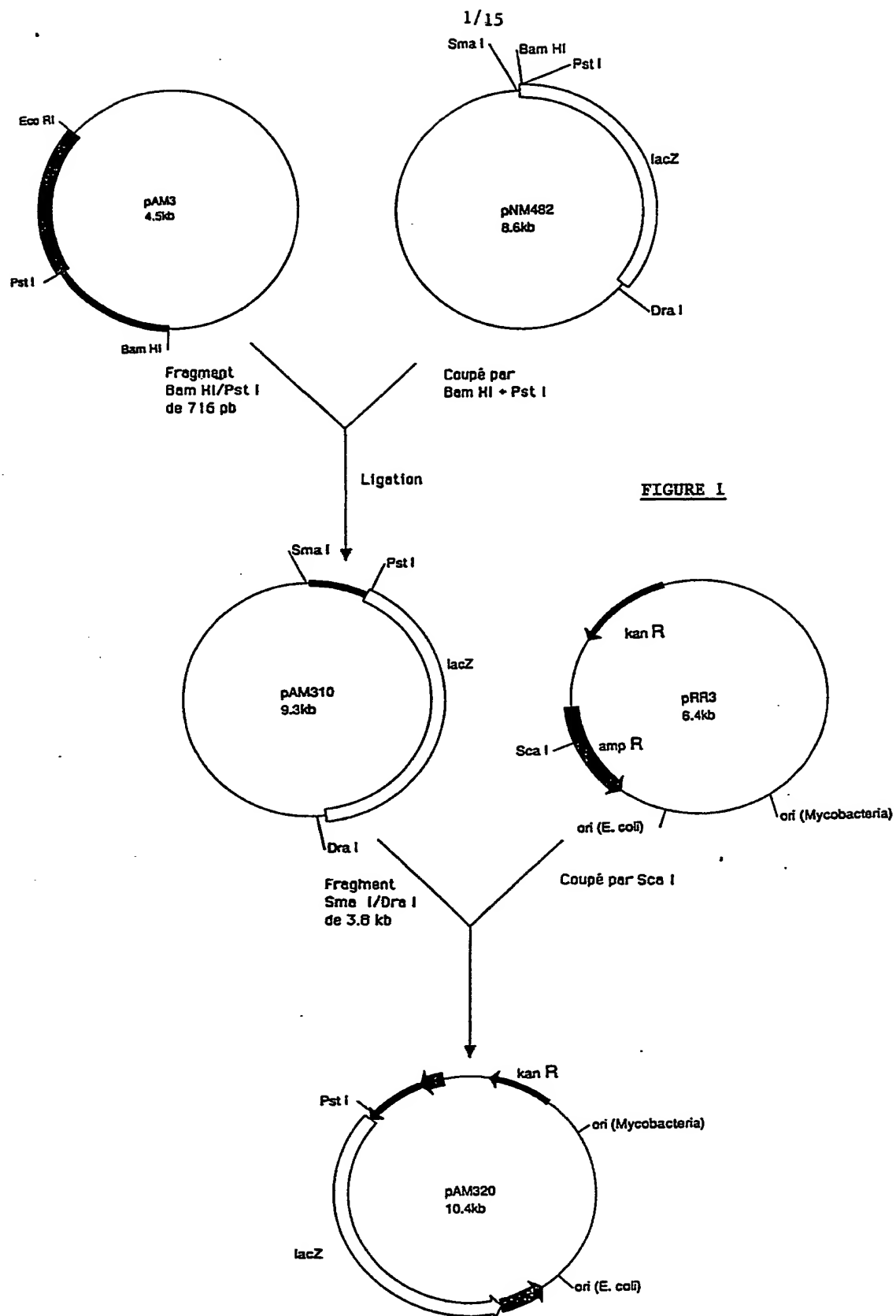
18. Vecteur selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il est contenu dans la souche E.coli contenant le fragment de 716pb (PstI/BamHI) cloné dans le vecteur pUC18, déposée à la Collection Nationale des Microorganismes, le 23 Octobre 1991 sous le n° I-1157.

19. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 est en amont de la ou des séquence (s) d'acide nucléique qu'il contrôle.

20. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 est en aval de la ou des séquence (s) d'acide nucléique qu'il contrôle.

21. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisé en ce qu'il comporte un marqueur d'expression.
22. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 14 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des éléments de régulation de l'expression dans un hôte cellulaire donné de la ou des séquence (s) d'acide nucléique qu'il contient.
23. Hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il est transformé par une séquence nucléotidique recombinante selon l'une quelconque des revendications 5 à 12 ou par un vecteur selon l'une quelconque des revendications 14 à 22, dans des conditions permettant l'expression de la (des) séquence (s) d'acide nucléique contenue (s) dans la séquence recombinante ou dans le vecteur.
24. Hôte cellulaire recombinant selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il permet l'exposition à sa surface, voire l'exportation, la sécrétion ou l'excrétion du produit d'expression de la (des) séquence (s) d'acide nucléique qu'il contient.
25. Hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souche d'Actinomycète, de préférence une souche avirulente de M. bovis telle que la souche BCG.
26. Hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactérie à Gram-négatif, par exemple E.coli.
27. Hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactérie à Gram-positif telle que B. subtilis ou Streptomyces.

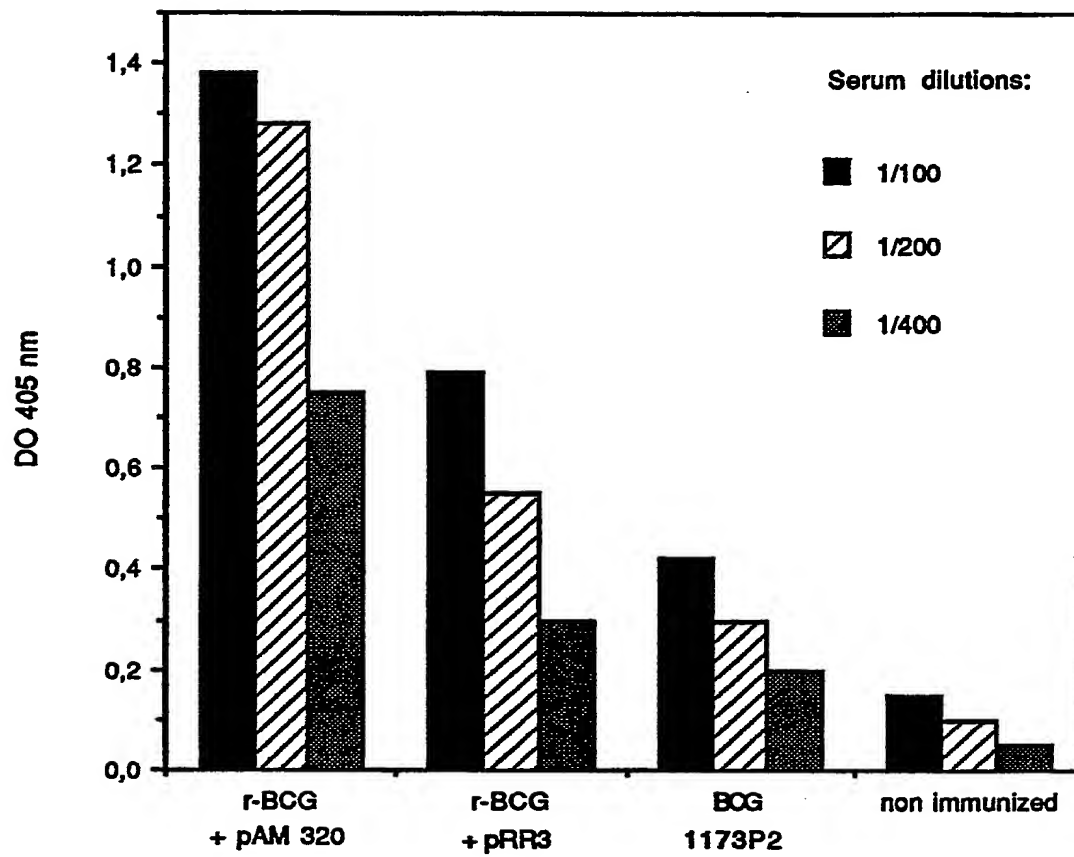
28. Composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend un hôte cellulaire recombinant selon l'une quelconque des revendications 23 à 24 en quantité suffisante pour déclencher la production d'anticorps ou contribuer à la production d'anticorps de préférence protecteurs chez un hôte animal ou humain auquel elle est administrée et/ou d'une réponse immunitaire cellulaire, en particulier une réponse CTL.



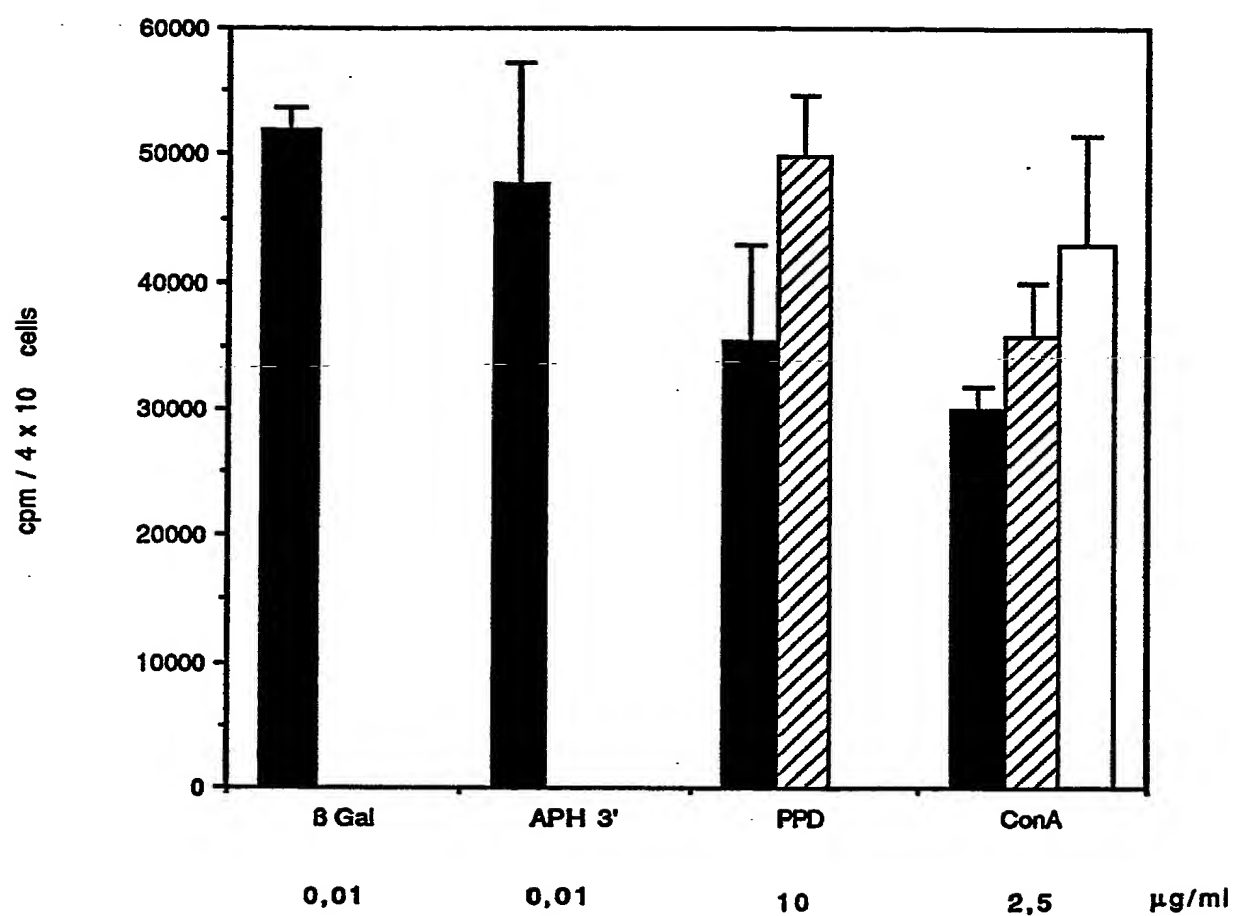
2/15

1
GAT CCC GTG ACA AGG CCG AAG AGC CCG CGA CCG TGC GGT CGT CGA CGA
(-35)
CCG AGT GTG AGC AGA CCC CCT GGT GAA GGG TGA ATC GAC AGG TAC ACA
101 (-10) +1
CAG CCG CCA TAC ACT TCG CTT CAT GCC CTT ACG GGG GGC GGC CAA CCC
AGA AGG AGA TTC TCA ATG ACG TTG TCA AGC CGC CGC GGT AGT GGT TGC
SD Met Thr Leu Ser Ser Arg Arg Gly Ser Gly Cys
201
GGG GTG GTA GAC AGC GTG GTC GCG CAG CAT GGC CCA CAG GAC GTT GAG
Gly Val Val Asp Ser Val Val Ala Gln His Gly Pro Gln Asp Val Glu
GCG GCG GCG GGC CAG GGC GAG GAC GGC TTG GGT GTG GCG TTT TCC TTC
Ala Ala Ala Gly Gln Gly Glu Asp Gly Leu Gly Val Ala Phe Ser Phe
301
GGT GCG TTT TCG GTC GTA GTA GGT GCG CGA GGA GGG GTC GGT GCG GAT
Gly Ala Phe Ser Val Val Val Gly Ala Arg Gly Gly Val Gly Ala Asp
GCT GAC CAA GGC CGA CAG GTA GCA GGC GCG CAG CAG GCG CCG GTC GTA
Ala Asp Gln Gly Arg Gln Val Ala Gly Ala Gln Gln Ala Pro Val Val
401
GCG TCG GGG GCG TTT GAG GTT TCC GCT GAT GCG GCC GGA ATC TCG TGG
Ala Ser Gly Ala Pha Glu Val Ser Ala Asp Ala Ala Gly Ile Ser Trp
TAC CGG CGC CAG GCC GGC GAC GCC GGC GAG GCG GTC GGC GGA GGC GAA
Tyr Arg Arg Gln Ala Gly Asp Ala Gly Glu Ala Val Gly Gly Gly Glu
501
TGC GGC CAT GTC CCC GCC GGT GGC GGC GAG GAA CTC AGC GCC CAG GAT
Cys Gly His Val Pro Ala Gly Gly Gly Glu Glu Leu Ser Ala Gln Asp
GAC GCC GAA TCC GGG CAT GCT CAG GAT GAT TTC GGC GTG GCG GTG GCG
Asp Ala Glu Ser Gly His Ala Gln Asp Asp Phe Gly Val Ala Val Ala
601
GCG AAA TCG CTC CTC GAT CAT CGC GTC GGT GTC GCC GAT TTC GGT GTC
Ala Lys Ser Leu Leu Asp His Arg Val Gly Val Ala Asp Phe Gly Val
GAG GGC CAT CAC CTC CTT GGC CAG GCG GGC CAC CAC AGT GGC CGC CAG
Glu Gly His His Leu Leu Gly Gln Ala Gly His His Ser Gly Arg Gln
701 716
TTG TTG GCC GGG CAC GAT GCT GTG TTG GGC GTT AGC GGC CTG CA
Leu Leu Ala Gly His Asp Ala Val Leu Gly Val Ser Gly Leu

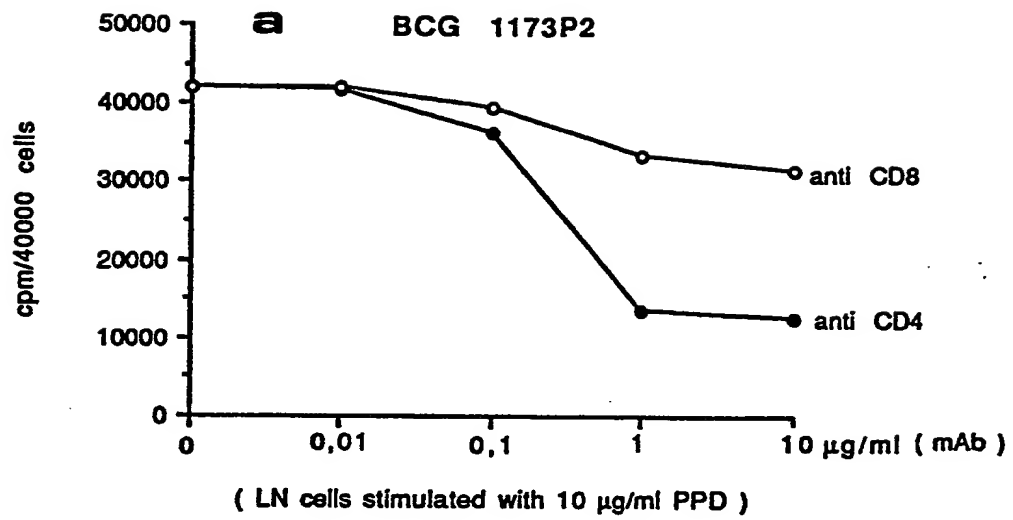
FIGURE 2

**FIGURE 3**

4/15

FIGURE 4

5/15

FIGURE 5 (a)

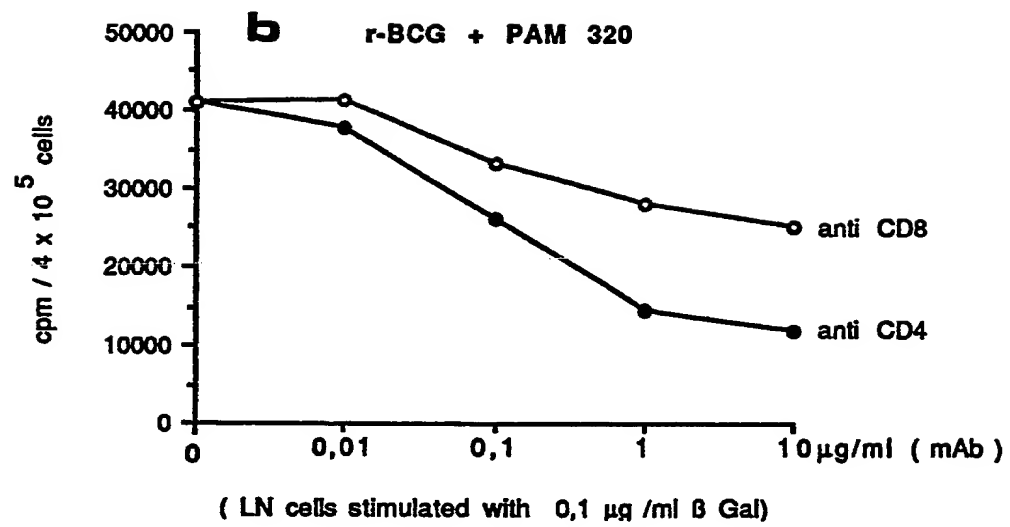


FIGURE 5 (b)

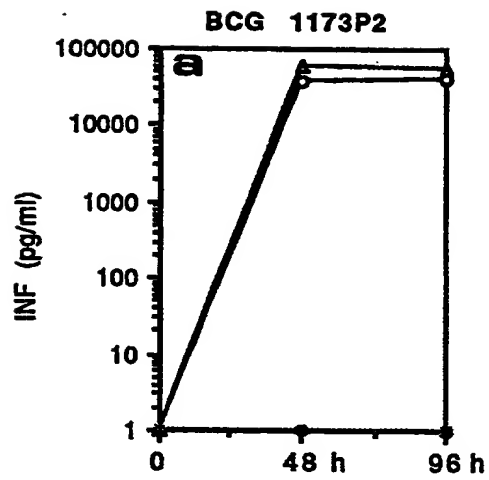
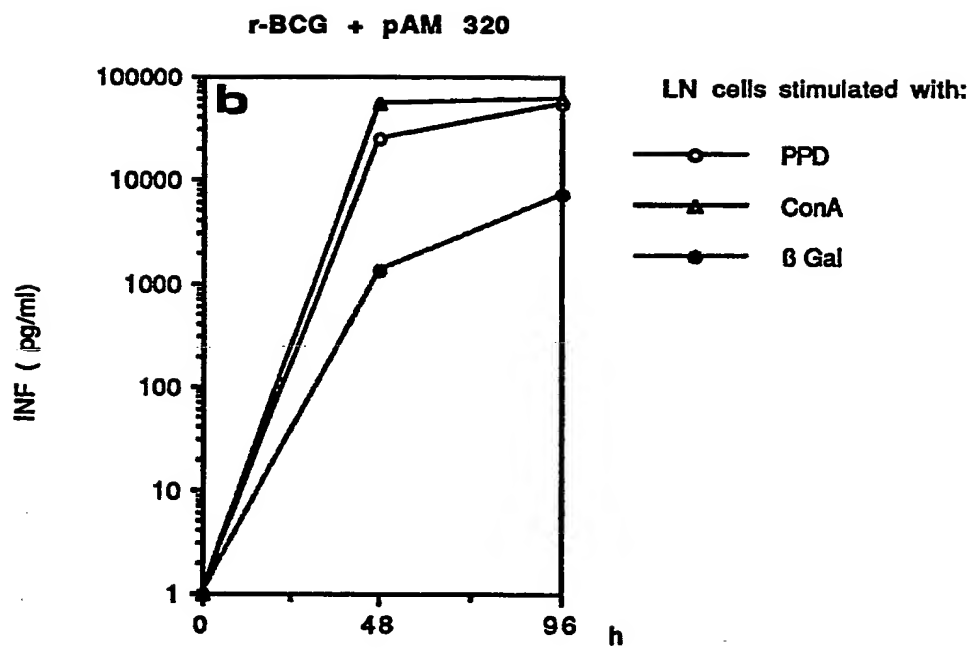


FIGURE 6 (a)

FIGURE 6 (b)

Amorce N°2
5' AACATATGAGATCTTCTCCTTCTGGTTGGCCGCCCC 3'

Position des amorces sur le fragment à amplifier:

CCCTCTAGAAATTCGTTGACAAAGGCCGGAAGAGCCCGGA 3' 1 11 21 31 41 51
GATCCCGTGACAAAGGCCGGAAGAGCCCGGCCGTGCGGTCTGACGACCGAGTGTC

61 71 81 91 101 111
AGCAGACCCCTGGTGAAGGTGAATCGACAGGTACACAGCCGCATACACTTCG

121 131 141 151 161
CTTCATGCCCTTACGGGGGGGGCCCAACCAGAGGAGATTCTCA ATG ACG TTG
SD Met Thr Leu
3' CCCCGCCGGTTGGGTCCTTCCTCTCTAGA GTA TAC AA

171 Ser Ser Arg Arg
TCA AGC CGC CGC

FIGURE 7

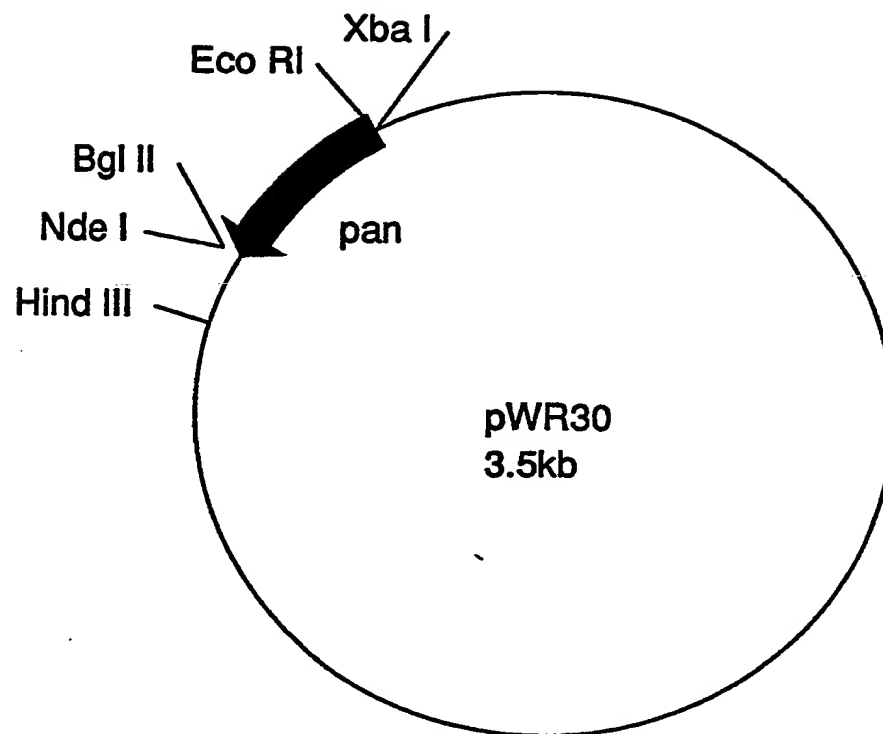


FIGURE 8

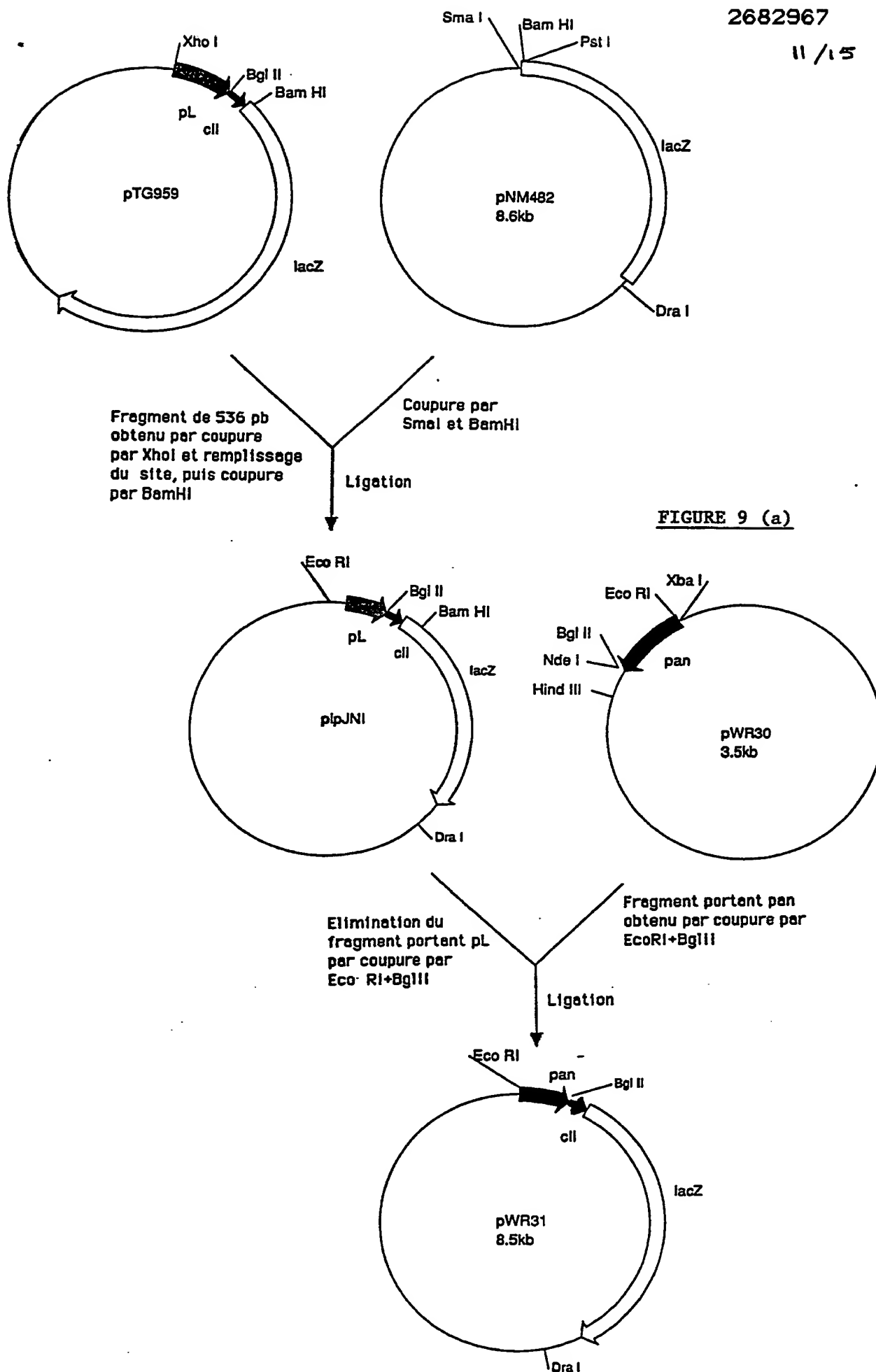
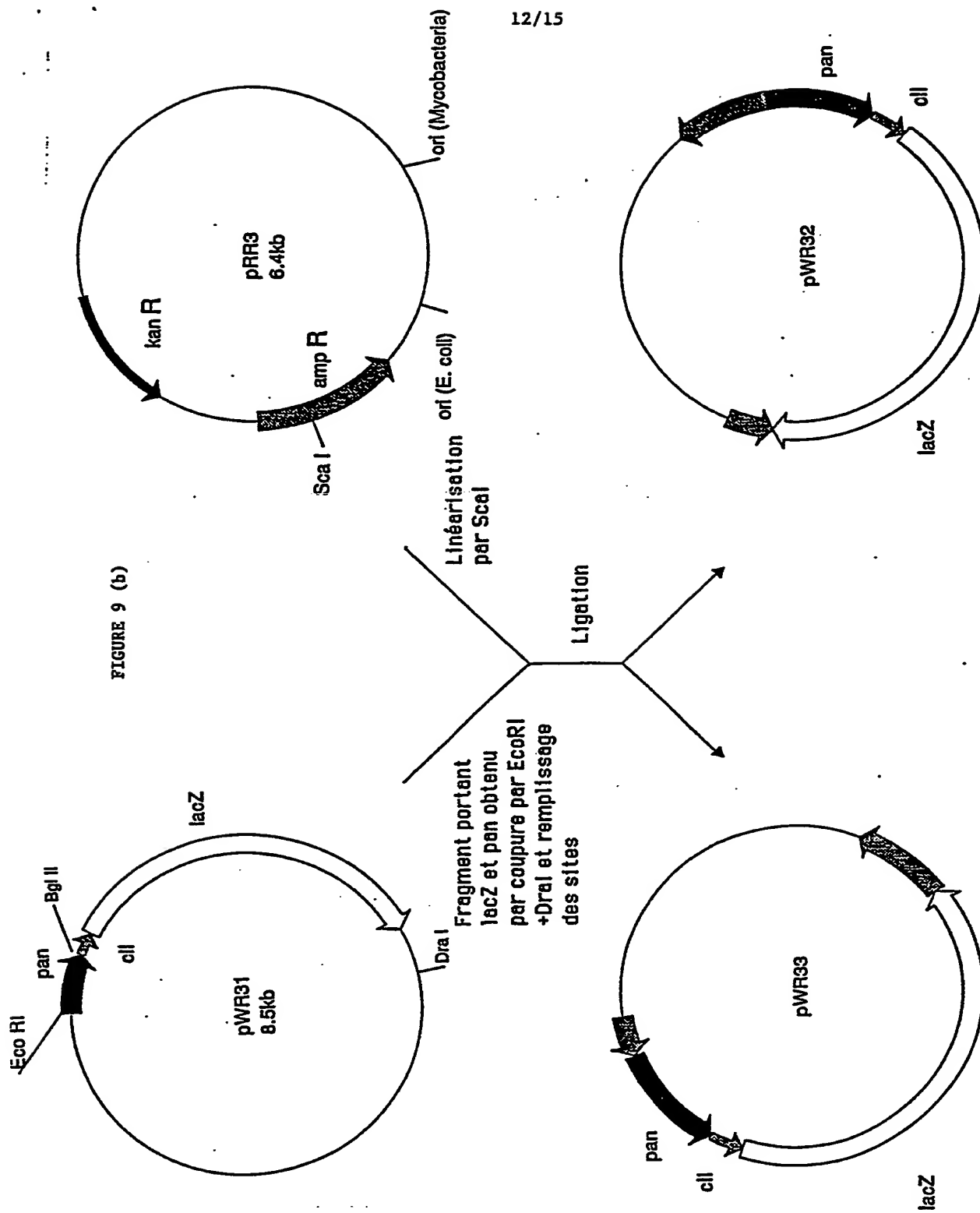


FIGURE 9 (a)

12/15



1 GAT CCC GTG ACA AGG CCG AAG AGC CCG CGA CCG TGC GGT GGT CGA CGA CCG AGT GTG AGC AGA CCC CCT GGT GAA GGG TGA ATC GAC AGG 81
 91 TAC ACA CAG CCG CCA TAC ACT TCG CTT CAT GCC CTT ACG GGG GGC CAA CCC AGA AGG AGA TTC TCA ATG ACG TTG TCA AGC CCG CGC 171
 181 GGT AGT GGT TGC GGG GTG GTA GAC AGC GTG GTC GCG CAT GGC CCA CAG GAC GTT GAG GCG GCG GCG GCG CAG GGC GAG GAC GGC TTG 261
 Gly Ser Gly Cys Gly Val Val Asp Ser Val Val Ala Gln His Gly Pro Gln Asp Val Glu Ala Ala Gln Gly Gln Gly Asp Gly Leu 251
 271 GGT GTG GCG TTT TCC TTC GGT GCG TTT TCG GTC GTA GTA GGT GCG CGA GGA GGG GTC GGT GCG GAT GCT GAC CAA GGC CGA CAG GTA GCA 351
 Gly Val Ala Phe Ser Phe Gly Ala Phe Ser Val Val Val Gly Ala Arg Gly Gly Val Gly Ala Asp Ala Asp Gln Gly Arg Gln Val Ala 341
 361 GCG GCG CAG CAG CCG GTC GTA GCG TCG GGG GCG TTT GAG GTT TCC GCT GAT GCG GCC GGA ATC TCG TGG TAC CCG GCG CAG GCC GGC 441
 Gly Ala Gln Gln Ala Pro Val Val Ala Ser Gly Ala Phe Gly Val Val Ser Ala Asp Ala Ala Gly Ile Ser Trp Tyr Arg Arg Gln Ala Gly 431
 451 GAC GCC GCG GCG GCG GCG GGA GGC GAA TGC GGC CAT GTC CCC GCC GGT GGC GCG GAG GAA CTC AGC GCC CAG GAT GAC GCC GAA TCC 531
 Asp Ala Gly Gln Ala Val Gly Gly Cys Gly His Val Pro Ala Gly Gly Gly Gln Ser Ala Gln Ser Ala Gln Asp Ala Glu Ser 521
 541 GGG CAT GCT CAG GAT TTC GGC GTG GCG GTG GCG GCG AAA TCG CTC CTC GAT CAT CCG GTC GGT GTC GCC GAT TTC GGT GTC GAG GGC 621
 Gly His Ala Gln Asp Asp Phe Gly Val Ala Val Ala Lys Ser Leu Leu Asp His Arg Val Gly Val Ala Asp Phe Gly Val Glu Gly 611
 631 CAT CAC CTC CTT GGC CAG GCG GGC CAC CAC AGT GGC CCG CAG TTG TTG GCG GCG CAC GAT GCT GTG TTG GGC GTT AGC GGC CTG CAG CGC 711
 His His Leu Leu Gly Gln Ala Gly His His Ser Gly Arg Gln Leu Leu Ala Gly His Asp Ala Val Leu Gly Val Ser Gly Leu Gln Arg 701
 721 GGT GGC TGC GAC GGT ATC GGC GTT GCG GGC CTT GCG TTT ACG CAA GAA GCG GGC TAC TCG AGC GCC ACC GGC GCT GCG CAG CGC GTC GGG 801
 Gly Gly Cys Asp Gly Ile Gly Val Ala Gly Leu Ala Phe Thr Gln Glu Arg Gly Tyr Ser Ser Ala Thr Gly Ala Ala Gln Arg Val Gly 791

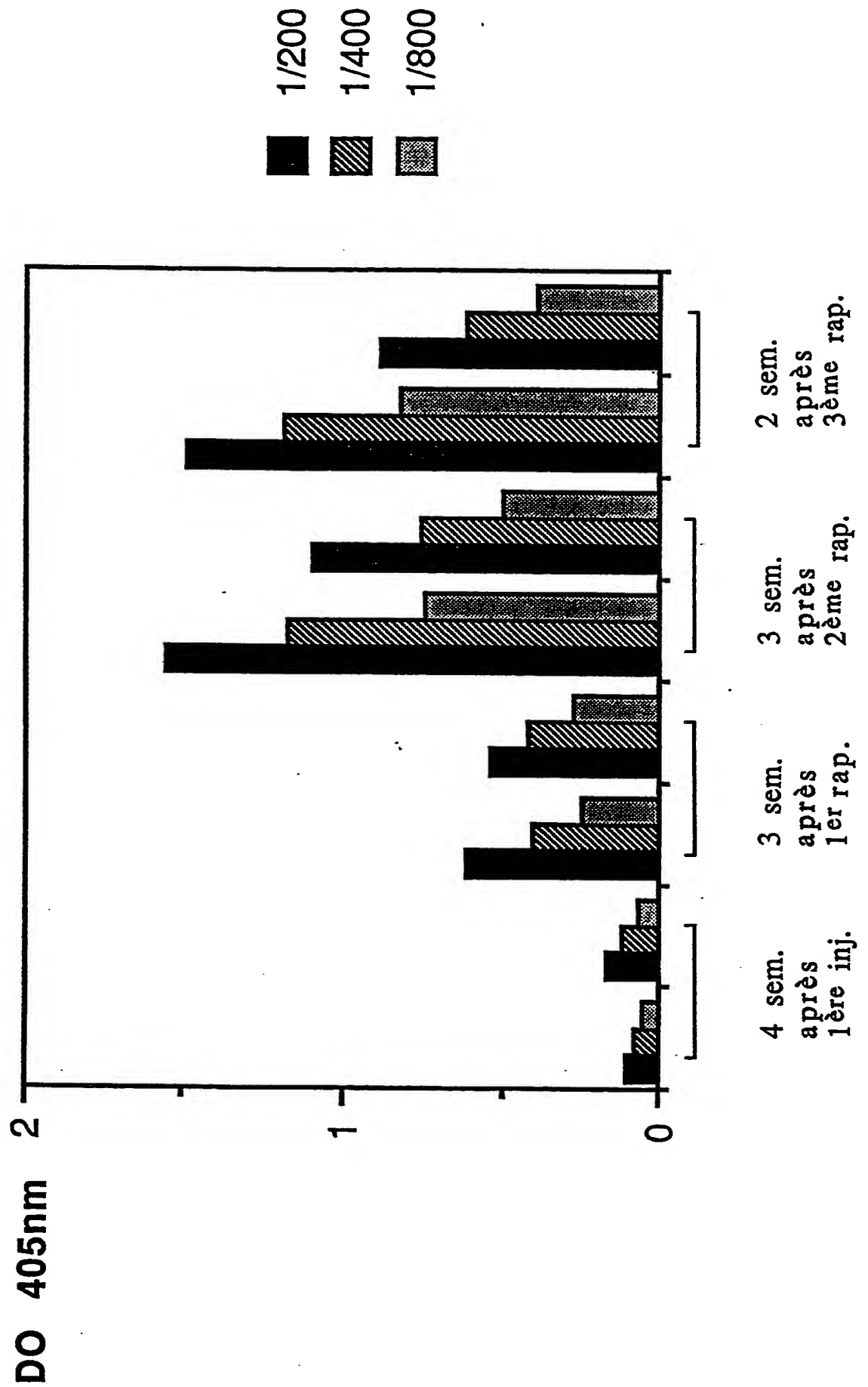
FIGURE 10 (a)

14/15

811 AGT TTG GTA GCC AGT AAG CAG GAT CAG CGC GGC ACG GCT CTT GTT GTA GTC GAA GGC GCG TTC CAG CGC CGG AAA GTA TTC CAG CAG CTG
 Ser Leu Val Ala Ser Lys Gln Asp Gln Arg Gly Thr Ala Leu Val Val Val Glu Gly Ala Phe Gln Arg Arg Lys Val Phe Gln Gln Leu
 901 GGC GCG CAT TCG GTT GAT CCG CCG GGT CCG ATC AGC CAC CAG ATC GGA ACG TCG GCT GGT CAG GAT GCG CAG CTC GAC TGC GAT GTC ATC
 Gly Ala His Ser Val Asp Arg Pro Gly Pro Ile Ser His Gln Ile Gly Thr Ser Ala Gly Gln Asp Ala Leu Asp Cys Asp Val Ile
 991 GGC GCG CAG AGG CTG CAA GTC GTG GCG CAT CCG GGC CTG ATC GGC GAT GAT CCG AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT GCC TTC GCC GCG
 Ala Gly Ala Gln Arg Leu Gln Val Val Ala His Pro Gly Leu Ile Gly Asp Asp Arg Ser Val Phe Gly Val Gly Leu Ala Phe Ala Ala
 1081 GTA ACT ACC GCG GGC GTG ATG GAC CGT GCG CCC GGG AAT ATA AAG CAG CCG CTG CCC GGC AGC GAT GAG CAA GGC GAT CAG CAA CCG GCG
 Val Thr Thr Arg Gly Val Met Asp Arg Ala Pro Gly Asn Ile Lys Gln Pro Leu Pro Gly Ser Asp Glu Gln Gly Asp Gln Gln Arg Gly
 1171 GCC GCG GGT GAG GTC GAT CCG CCA CGT GAC CTC GCC TCC ATC GGC CAA CGT CGT CAC GCG CCG AAA TCA ACT CCA GCA GCG CCG CCT
 Ala Ala Gly Val Glu Val Asp Arg Pro Arg Asp Leu Ala Ser Ile Gly Gln Arg Arg His Arg Arg Lys Ser Thr Pro Ala Ala Arg Pro
 1261 CGT TGG CCA CCC GCT GCG AGA GCA ATC GCT GCG CGT CGT TAA TAA CCA TGC AGT AAT GGT CCG CCT TAC CCG CGT CCA CCG CCG
 Arg Arg Trp Pro Pro Ala Ala Arg Ala Ile Ala Ala Arg Arg Arg Ter
 1351 CCC AGA CAG GTT GTG CCA CAA CCA CCT CCG TAA CCG TCA TTG TCC AGA TCA ACC CAG CAG ACG ACC CCG ACG CGG TGT CCT TAC ACA GCG
 1441 ATC CAA TCG CAT CTC TCA ATT AGC GGT CGA GTC GTC GCG GGA CCG CCG GCG GCC AAT CTC CTT CCG CCA TCC AAC ACA GCA ACC ACA TGA
 1531 AAG CCA TAC CCG ACG TCC CTG GGC AAT TCG AAG CCT AAG CCG ACG GCC CCG AAC ACC CTT CAA GAA AGG TAA GGA ATT

FIGURE 10 (b)

FIGURE 11

 β -galactosidase

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9113227
FA 463158

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	ABSTRACTS OF THE 91ST GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY; ABSTR.NO. U-27 1991, WASHINGTON, US page 147; T. J. GOIST ET AL.: 'Molecular Cloning and Characterization of Mycobacterium paratuberculosis Promoter in Escherichia coli' * le document en entier * & 91ST GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY; 5-9 MAY 1991 DALLAS, TEXAS, US ---	1
D,A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH. vol. 17, no. 22, 1989, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 9063 - 9073; E. P. GREEN ET AL.: 'Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of mycobacterium paratuberculosis' * figure 3 * ---	1
A	WORLD PATENTS INDEX LATEST Week 9128, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 91-200914 [28] & AU-A-6 672 790 (MASSEY UNIVERSITY) 23 Mai 1991 * abrégé * & GENESEQ PROTEIN SEQUENCE DATABASE; DERWENT PUBLICATIONS LTD., LONDON, GB; AN: Q12491 ---	1
A	NATURE, vol. 351, 6 Juin 1991, LONDON GB pages 456 - 460; C. K. STOVER ET AL.: 'New use of BCG for recombinant vaccines' -----	
Date d'achèvement de la recherche 02 JUIN 1992		Examinateur THIELE U.H.-C.H.
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

2
EPO FORM 1503 GLB2 (PM13)

THIS PAGE BLANK (USPTO)